

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Pavlína Jančová

Vliv sekretomu mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z Whartonova rosolu
na terapii poranění míchy u potkanů
Effect of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells secretome in the treatment of rat
spinal cord injury

Diplomová práce

Školitelka: Ing. Milada Chudíčková, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Ing. Miladě Chudíčkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při psaní diplomové práce a přátelský přístup, a také ostatním členům laboratoře za ochotu při vysvětlování nových metod.

Tato práce byla podporována projektem MŠMT ČR LO1309 a projektem GA ČR 17-03765S.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 6. 2020

Bc. Pavlína Jančová

Abstrakt

V experimentálních modelech míšních poranění bylo ukázáno, že transplantace mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z Whartonova rosolu vede ke zlepšení motorických a senzorických funkcí léčených zvířat, stejně jako k podpoře neuroregenerace, angiogeneze a imunomodulace. Tyto buňky ale jen omezeně migrují do místa poranění, přežívají krátkou dobu a působí především svým sekretomem. Proto je studován alternativní přístup bezbuněčné terapie spočívající v aplikaci kondiciovaného média připraveného kultivací kmenových buněk. V této diplomové práci byl porovnán léčebný účinek lidských mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z Whartonova rosolu a jejich kondiciovaného média při opakované intratekální aplikaci potkanům s modelovým míšním poraněním: balónkovou ischemickou kompresní lézí. Po navození léze byly potkanům podány tři dávky kmenových buněk nebo kondiciovaného média s týdenními rozestupy. Následujících devět týdnů byly prováděny behaviorální testy, ve kterých došlo k signifikantnímu zlepšení obou léčených skupin oproti neléčené kontrole. Aplikace kondiciovaného média a kmenových buněk dále vedla ke zvýšení plochy nepoškozené míšní tkáně a ke zvýšení relativní exprese genů spojených s neuroregenerací, ačkoli nedošlo ke snížení plochy samotné gliové jizvy. Oproti aplikaci kmenových buněk vedla aplikace kondiciovaného média ke snížení počtu reaktivních astrocytů. U této skupiny bylo rovněž pozorováno více prodlužujících se nervových vláken. Tyto výsledky potvrzují, že aplikace kondiciovaného média představuje vhodnou náhradu kmenových buněk při terapii míšních poranění.

Klíčová slova: míšní poranění, mezenchymální kmenové buňky, Whartonův rosol, sekretom, kondiciované médium, potkaní model

Abstract

As previously shown, transplantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in the experimental model of spinal cord injury leads to the motor and sensory functions improvement, supports neuroregeneration, angiogenesis and provides immunomodulation. On the other hand, these cells have limited migration and survival capacity, and their therapeutic effect is mediated mostly by their secretome. Therefore, application of mesenchymal stem cells derived conditioned medium is studied as an alternative option for cell therapy. In this thesis, therapeutic effect of repeated intrathecal delivery of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and their conditioned media in the treatment of spinal cord injury was compared. After induction of a balloon ischemic compression lesion, stem cells or conditioned media were administered weekly in three doses. Behavioral analyses were carried out up to nine weeks after spinal cord injury and revealed significant improvement of both treated groups compared to the untreated saline control. Application of stem cells and conditioned media also resulted in a higher amount of spared tissue and enhanced expression of genes related to neuroregeneration, although the size of glial scar was not reduced. Compared to application of stem cells, application of conditioned media led to a decrease in the number of reactive astrocytes. Treatment with conditioned media was also more efficient in axonal sprouting improvement. These results confirmed that application of conditioned media represents a suitable alternative to direct stem cells transplantation for the treatment of spinal cord injury.

Keywords: spinal cord injury, mesenchymal stem cells, Wharton's jelly, secretome, conditioned medium, rat model

Obsah

Seznam zkratk	1
1 Úvod.....	3
2 Literární přehled	4
2.1 Míšní poranění.....	4
2.1.1 Regenerace centrální nervové soustavy.....	4
2.1.2 Mícha	5
2.1.3 Etiologie míšního poranění	5
2.1.4 Primární a sekundární poranění.....	6
2.1.5 Gliová jizva.....	8
2.2 Léčba míšního poranění.....	9
2.2.1 Současná léčba a prognóza.....	9
2.2.2 Experimentální terapie	10
2.3 Mezenchymální kmenové buňky	14
2.3.1 Vlastnosti a terapeutický potenciál mezenchymálních kmenových buněk	14
2.3.2 Kondiciované médium	16
2.3.3 Mezenchymální kmenové buňky a jejich sekretom v terapii míšního poranění	16
2.3.4 Whartonův rosol jako zdroj mezenchymálních kmenových buněk	17
3 Cíl práce	19
4 Materiály a metody.....	20
4.1 Zvířata	20
4.2 Model míšního poranění	20
4.3 Izolace, kultivace WJ-MSCs a příprava KM	21
4.4 Proces léčby.....	21
4.5 Behaviorální testování	22
4.5.1 BBB test.....	22
4.5.2 Beam walk test.....	23
4.5.3 Plantar test	24
4.6 Histologická analýza.....	24
4.7 Analýza genové exprese	25
4.8 Statistická analýza	27
5 Výsledky	28
5.1 Provedení operace a aplikace léčebných látek	28
5.2 Behaviorální testování	29
5.2.1 BBB test.....	29

5.2.2	Beam walk test	29
5.2.3	Plantar test	30
5.3	Histologická analýza.....	31
5.3.1	Zachovaná bílá a šedá hmota míchy.....	31
5.3.2	Astroglióza a gliová jizva.....	32
5.3.3	Axonální růst.....	33
5.4	Analýza genové exprese	34
6	Diskuze	36
7	Závěr.....	43
8	Použitá literatura.....	44
9	Přílohy	55
9.1	Publikovaný článek.....	55

Seznam zkratek

zkratka	český význam	anglický původ
ASIA	Americká asociace spinálního poranění	American Spinal Injury Association
AIS	stupnice vytvořená asociací ASIA	ASIA Impairment Scale
BBB	Basso, Beattie, Bresnahan (test)	
<i>Bcl2/Bcl2</i>	„B lymfom 2“ regulátor apoptózy	“B-cell lymphoma 2“ apoptosis regulator
BDNF	mozkový neurotrofický faktor	brain-derived neurotrophic factor
BW	(test) chůze na kladině	beam walk (test)
<i>Casp3</i>	kaspáza 3	caspase 3
<i>Ccl 3/5</i>	C-C chemokinový ligand 3/5	C-C motif chemokine ligand 3/5
CD	diferenční skupina	cluster of differentiation
CNS	centrální nervová soustava	
CNTF/ <i>Cntf</i>	ciliární neurotrofický faktor	
CSPG/ <i>Cspg</i>	chondroitin sulfát proteoglykan	
Ct hodnota	cyklus prahu	cycle of threshold
ESCs	embryonální kmenové buňky	embryonic stem cells
FGF2/ <i>Fgf2</i>	fibroblastový růstový faktor	fibroblast growth factor
HGF	hepatocytární růstový faktor	hepatocyte growth factor
GAP43/ <i>Gap43</i>	protein asociovaný s růstem 43	growth associated protein 43
<i>Gapdh</i>	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
G-CSF	granulocytární kolonie stimulující faktor	granulocyte colony stimulating factor
GDNF	gliový neurotrofický faktor	glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP/ <i>Gfap</i>	gliální fibrilární acidický protein	glial fibrillary acidic protein
HLA	hlavní lidský histokompatibilní antigen	human leukocyte antigen
IDO	indolamin-2,3-dioxygenáza	
IL/ <i>Il</i>	interleukin	
INF	interferon	
<i>Irf5</i>	interferon regulující faktor 5	
KM	kondicionované médium	
MHCII	hlavní histokompatibilní komplex II	major histocompatibility complex II
<i>Mrc1</i>	manózoový receptor C-typu 1	
MSCs	mezenchymální kmenové buňky	mesenchymal stem cells
AT-MSCs	izolované z tukové tkáně	adipose tissue derived MSCs
BM-MSCs	izolované z kostní dřeně	bone marrow derived MSCs

WJ-MSCs	izolované z Whartonova rosolu	Wharton's jelly derived MSCs
<i>Nfkb</i>	nukleární faktor kappa B	
NG2	neuron-gliální antigen 2	
NGF	nervový růstový faktor	nerve growth factor
nkM	nekondiciované kontrolní médium	
NOS2/ <i>Nos2</i>	syntetáza oxidu dusnatého 2	nitric oxide synthase 2
NSCs	neurální kmenové buňky	neural stem cells
OECs	olfaktorické glie	olfactory ensheathing cells
PBS	fosfátový pufr	phosphate-buffered saline
PNS	periferní nervová soustava	
SCI	míšní poranění (míšní léze)	spinal cord injury
SCs	kmenové buňky	stem cells
TGFβ	transformující růstový faktor β	transforming growth factor β
TNFα/ <i>Tnfa</i>	faktor nekrotizující nádory α	tumor necrosis factor α
<i>VegfA</i>	vaskulární endoteliální růstový faktor A	vascular endothelial growth factor A
WJ	Whartonův rosol	Wharton's jelly

1 Úvod

Poranění míchy, jinými slovy míšní léze (spinal cord injury, SCI) představuje závažný stav, který ve většině případů vede k celoživotní ztrátě či omezení motorických, senzorických a vegetativních funkcí míchy. Míra těchto omezení závisí na příčině, rozsahu a lokalizaci poranění. To nejenže omezuje každodenní činnosti pacienta, ale také to má výrazný socioekonomický dopad na něj a jeho blízké.

Ačkoli se péče o pacienty s poraněním míchy během posledních let výrazně zlepšila, stále neexistuje efektivní způsob, jak navrátit poškozené funkce. V reakci na prvotní inzult vedoucí k poranění míchy probíhají následující měsíce procesy způsobující rozsáhlá sekundární poranění. V chronické fázi je ustanoveno prostředí dlouhodobě inhibující endogenní regeneraci, nevhodné pro obnovení poškozených neuronů. Vyvíjí se proto velké úsilí k nalezení terapeutických prostředků, které budou mít neuroprotektivní a neuro-regenerační účinky.

V preklinických a v omezené míře i v klinických studiích se ukázala prospěšná transplantace mezenchymálních kmenových buněk. Jejich terapeutický efekt je přisuzován především sekreci širokého spektra látek, včetně růstových faktorů, cytokinů a chemokinů, které modulují mikroprostředí míšní léze, tlumí zánět, stimulují vaskularizaci a neuro-regeneraci. Pacientům by proto mohl být podán pouze tento sekretom, což by obešlo nevýhody buněčné terapie. V této práci proto byly sledovány terapeutické účinky sekretomu mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z Whartonova rosolu (součást pupečníku) na regeneraci poraněné míchy. Tento sekretom byl aplikován ve formě kondiciovaného média. Zároveň byly jeho účinky přímo porovnány s aplikací samotných buněk.

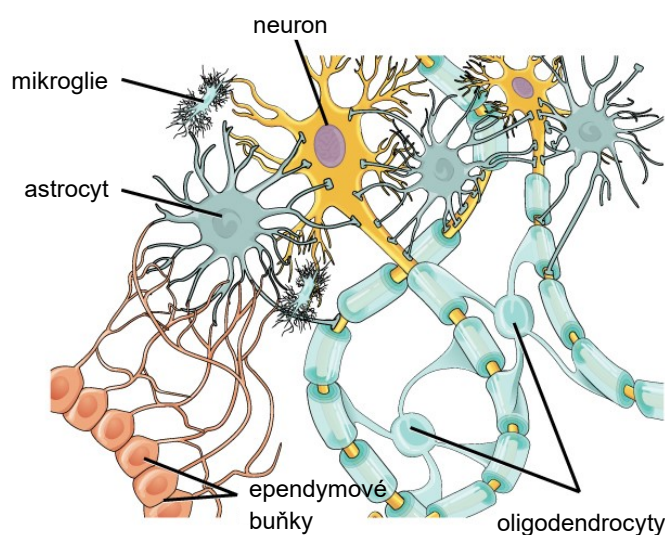
Získaná data prezentovaná v této diplomové práci byla publikována v článku: „Chudickova, M. *et al.* The Effect of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Their Conditioned Media in the Treatment of a Rat Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 4516 (2019),“ který je uveden v příloze 9.1.

2 Literární přehled

2.1 Míšní poranění

2.1.1 Regenerace centrální nervové soustavy

Nervová soustava je tvořena dvěma typy buněk: neurony, aktivními buňkami přenášejícími signál, a podpůrnými gliovými buňkami, které zajišťují homeostázu tkáně (Obrázek 1). Mezi gliové buňky centrální nervové soustavy (CNS) patří astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie a ependymové buňky, v periferní nervové soustavě (PNS) se nacházejí Schwannovy buňky a satelitové buňky. Neurony i neuroglie se mohou v průběhu života omezeně regenerovat pomocí neurálních kmenových buněk (neural stem cells, NSCs), které se v dospělém mozku nacházejí ve dvou nikách: v subventrikulární zóně postranních komor a subgranulární zóně hipokampu, kde se dělí a diferencují v progenitorové buňky, které postupně vyzrávají a ztrácejí schopnost sebeobnovy.¹ Populace NSCs se nachází i v dospělé míše, její proliferací potenciál je však omezený a diferenciací vznikají pouze gliové buňky.²



Obrázek 1 – Gliové buňky centrální nervové soustavy. Gliové buňky podporují, vyživují a chrání neurony. Oligodendrocyty tvoří svými výběžky izolační myelinové vrstvy kolem axonů. Astrocyty jsou součástí hematoencefalické bariéry, zprostředkovávají výživu a výměnu látek, nepřímo se podílí na vedení vzruchu např. regenerací neurotransmiterů. Mikroglie fagocytují mrtvé buňky a patogeny. Ependymové buňky vystylají mozkové komory a míšní kanál a podílí se na tvorbě mozkomíšního moku. Upraveno dle Molnar a Gair.³

Při poranění má CNS v porovnání s PNS velmi omezený regenerační potenciál kvůli rozdílným látkám v prostředí a reakci gliových buněk (shrnutí v Brosius Lutz a Barres).⁴ Po přerušení axonu probíhá v distální části oddělené od těla neuronu Wallerova degenerace a myelinová vrstva se rozpadá. V PNS je debris a myelin brzy a efektivně fagocytovaný makrofágy a regenerace je podpořena aktivitou Schwannových buněk oddělených od axonu, které produkují neurotrofní látky např. gliový neurotrofní faktor (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF), mozkový neurotrofní faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), ciliární neurotrofní faktor (ciliary neurotrophic factor, CNTF) a nervový růstový faktor (nerve growth factor, NGF). Oproti tomu oligodendrocyty, které mají v CNS stejnou fyziologickou roli jako Schwannovy buňky v PNS (tj. tvorbu myelinových obalů kolem axonů), po ztrátě kontaktu s axony odumírají apoptózou nebo přechází do klidového stavu a nepodílejí se na remyelinizaci. Fagocytóza debris probíhá v CNS velmi pomalu, a proto dlouhodobě zůstává v extracelulárním prostředí myelin a s ním asociované proteiny např. Nogo-A, které inhibují axonální růst. Stejný charakter mají i proteiny produkované buňkami gliové jizvy, především chondroitin sulfát proteoglykany (CSPG).

2.1.2 Mícha

Mícha je nervová trubice zprostředkovávající komunikaci mezi mozkem a periferií. Je uložena v páteřním kanálu a podobně jako mozek je obalena třemi plenami – omozečnicí (*pia mater*), pavučnicí (*arachnoidea*) a vnější tvrdou plenou (*dura mater*). Prostor mezi omozečnicí a pavučnicí (subarachnoideální prostor) je vyplněn mozkomíšním mokem, který chrání míchu před otřesy, ale také zajišťuje homeostázu tkáně a odvod metabolitů. Průchod látek a buněk mezi krví a míšní tkání je regulován hematoencefalickou bariérou.

Nervová tkáň je tvořena bílou a šedou hmotou. V případě míchy bílá tkáň (výběžky neuronů) tvoří povrch, zatímco šedá tkáň (těla neuronů) je uložena v hloubce kolem centrálního kanálu. Šedá hmota tvoří na transverzálním řezu obrazec tvaru motýla nebo písmene H. Mícha je u člověka složena z 31 segmentů, které odpovídají oblastem přilehlých obratlů (8 krčních, 12 hrudních, 5 bederních, 5 křížových a 1 kostrčního), přičemž z každého segmentu vychází jeden pár míšních nervů. U potkanů je těchto segmentů 34 (8 krčních, 13 hrudních, 6 bederních, 4 křížové a 3 kostrční).

2.1.3 Etiologie míšního poranění

Poranění míchy vede k omezení nebo ztrátě funkcí v poraněném segmentu a všech segmentů kaudálním směrem. Celosvětově je většina případů SCI způsobená úrazem (zhruba

2/3 případů v ČR), a to nejčastěji v důsledku dopravních nehod a pádů. Mezi další časté příčiny patří sportovní úrazy, skoky do vody a násilné činy. Netraumatická poranění bývají způsobena cévním poškozením, infekcemi, degenerativními a nádorovými onemocněními.^{5,6} Roční incidence SCI se liší u různě vyspělých států, v USA se během posledních let pohybuje kolem 5 případů na 100 000 obyvatel, přičemž zranění bývají třikrát častěji muži než ženy.⁷ Podobné údaje platí i pro Českou republiku.⁶

SCI vzniká především v krční a hrudní oblasti míchy, a proto mezi nejčastější neurologické následky patří kvadruparéza (částečné ochrnutí všech končetin), následovaná paraplegií a parapézou (úplné nebo částečné ochrnutí dolních končetin).⁷

2.1.4 Primární a sekundární poranění

Patofyziologické mechanismy SCI lze rozdělit na primární a sekundární poranění, a časově na akutní (1-2 dny), subakutní (2 dny až 2 týdny), intermediální (týdny až měsíce) a chronickou fázi (měsíce až roky).⁸ Tato práce se dále soustředí na traumatická zranění, ale na základě pozorování zvířecích modelů lze soudit, že mechanismy sekundárního poranění jsou u traumatického a netraumatického zranění velmi podobné.⁹

Primárním poraněním je myšlena prvotní událost vedoucí k mechanickému poranění míchy. To může být způsobeno přímo např. nožem nebo kulkou, nebo nepřímo nefyziologickým pohybem páteře v důsledku nárazu, nadměrným natažením, rotací a/nebo dlouhodobým tlakem např. úlomků nebo luxací obratle. K úplnému přerušení míchy však dochází jen výjimečně.⁸

Sekundární poranění další tkáně vzniká jako kaskáda buněčných a biochemických reakcí na primární zranění a zahrnuje: vaskulární změny, edém, ischemii tkáně, excitotoxicitu, iontovou dysbalanci, produkci volných kyslíkových radikálů a další procesy způsobující buněčnou smrt, aktivaci a migraci gliových buněk, zánět, demyelinizaci a degeneraci axonů, vznik kavit a gliové jizvy.^{8,10}

Vlivem primárního poranění dojde k poškození neuronů, gliových buněk, cév a narušení hematoencefalické bariéry. Do několika minut se vytvoří v oblasti poranění otok, což působí další kompresi a spolu s krvácením a systémovými vlivy (hypotenze, respirační problémy) má za následek ischemii tkáně.¹⁰ Poškozené buňky uvolňují do extracelulárního prostředí mnoho látek včetně neurotransmiterů, alarminů a zánětlivých cytokinů, především faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor α , TNF α), interleukiny (IL) IL-1 β a IL-6.¹¹⁻¹³

Uvolnění nadměrného a neregulovaného množství excitačního neurotransmiteru glutamátu vede k procesu nazývaném excitotoxicita. Glutamát se naváže a aktivuje své

receptory na neuronech, gliových a endoteliálních buňkách, což způsobí influx Ca^{2+} . Dlouhodobé intracelulární zvýšení Ca^{2+} iontů aktivuje apoptotické dráhy závislé na mitochondriích, v důsledku jejich zatížení se nevytváří dostatek ATP, tím chybí substrát pro Na^+/K^+ ATPázu a prohlubuje se iontová dysbalance. Spolu s tím dochází k produkci kyslíkových a dusíkových radikálů, které reagují prakticky se všemi makromolekulami včetně lipidů, proteinů a DNA, a jsou tak dalším spouštěčem buněčné smrti. Ta však neprobíhá pouze apoptózou, ale také nekrózou a nekroptózou, které aktivují imunitní odpověď. Takto umírají zejména buňky poškozené při primárním inzultu, ale nekróza je pozorována i v následujících dnech. Apoptóza probíhá spíše později v okrajových částech léze a nejvíce je pozorovaná u oligodendrocytů. (Shrnuto v review Alizadeh *et al.*¹⁰)

Vlivem látek produkovaných poškozenými buňkami migrují k lézi aktivované gliové buňky a následně buňky imunitního systému. Do několika hodin se v centru léze objevují aktivované mikroglie, astrocyty a z krevního oběhu infiltrované neutrofilie.^{14–16} Reaktivní astrocyty ovlivňují zánět produkcí cytokinů, chemokinů a formováním gliové jizvy (viz kapitola 2.1.5). Aktivované mikroglie mají roli rezidentních makrofágů nervové soustavy a spolu s makrofágy odvozenými od cirkulujících monocytů, které do léze migrují během subakutní fáze, fagocytují buněčnou debris, myelin a červené krvinky.¹⁴ Na základě *in vitro* stimulace lze makrofágy rozdělit na M1 prozánětlivý fenotyp [stimulace interferonem γ ($\text{INF}\gamma$), lipopolysacharidem] a M2 regenerující fenotyp (stimulace IL4, IL13).¹⁷ Lokální prostředí SCI a povaha fagocytovaných látek způsobují, že v lézi převažují makrofágy a mikroglie podobné M1 typu,¹⁸ které se podílí na rozvoji zánětu a poškození tkáně (jsou lepšími antigen prezentujícími buňkami pro lymfocyty a produkují více kyslíkových radikálů než M2 typu podobné buňky), mají sníženou schopnost fagocytózy a brání regeneraci produkcí axon repulzivních molekul.^{19,20}

Na rozvoji zánětu se podílejí také buňky adaptivní imunity – T a B lymfocyty. Zánětlivé prostředí míšní léze naruší rovnováhu mezi regulačními a efektorovými lymfocyty. Jsou stimulované zejména M1 makrofágy/mikroglie, které produkují zánětlivé cytokiny a prezentují autoantigeny na hlavním histokompatibilním komplexu II (major histocompatibility complex II, MHCII), u člověka nazývaného lidský histokompatibilní komplex (human leukocyte antigen, HLA). Aktivované autoreaktivní T lymfocyty poté samy produkují zánětlivé cytokiny a přispívají k apoptóze buněk, zejména přes Fas ligand. B lymfocyty produkují neurotoxické autoprotilátky, které lyzují buňky aktivací komplementu a spouštějí fagocytózu přes Fc receptory na makrofázích/mikroglích.^{10,21} Na druhou stranu v místě léze byly nalezeny také antigenem nestimulované T lymfocyty produkující IL4, které by mohly

podporovat axonální regeneraci.²² Vlivem přítomnosti IL4 se může v lézi vytvořit subpopulace M2 makrofágů/mikroglíí, které produkují další protizánětlivé faktory [IL10, transformující růstový faktor β (transforming growth factor β , TGF β)].²³ V jiném případě poranění CNS byly detekované B regulační lymfocyty produkující protektivní IL10.²⁴ Imunitní odpověď v míšní lézi tak nelze označit pouze za škodlivou, ale spíše záleží na poměru přítomných typů buněk a jaký typ odpovědi převáží.

Během intermediální a chronické fáze se zánět dále nerozšiřuje, ale přetrvává, vzniká gliová jizva a kavity vyplněné zejména extracelulární tekutinou, mění se složení extracelulární hmoty, probíhá vaskulární reorganizace a snaha o remyelinizaci.²⁵ Většina přerušných axonů však zůstává dystrofickými a regenerace nervové tkáně je velmi omezena inhibičním prostředím, jak bylo popsáno v kapitole 2.1.1.

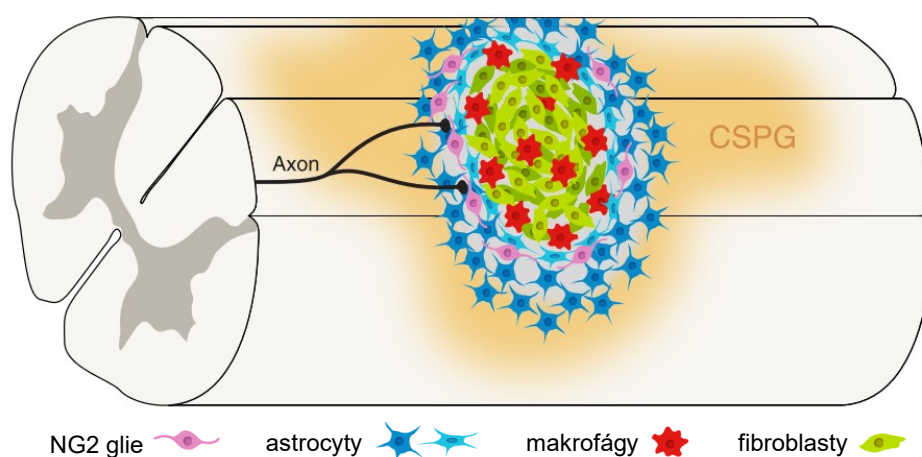
2.1.5 Gliová jizva

V chronické fázi přetrvává v místě poranění gliová jizva. Jedná se o fibrotickou tkáň tvořenou gliovými buňkami, fibroblasty, pericyty, makrofágy a modifikovanou extracelulární matrix bohatou na kolagen a CSPG (Obrázek 2).

Mezi gliové buňky podílející se na vzniku jizvy patří astrocyty a oligodendrocytární prekursorové buňky, jiným názvem NG2 glie kvůli pozitivní expresi neuron-gliálního antigenu 2 (NG2). Astrocyty se během procesu nazývaného astroglióza stanou hypertrofickými, zvýší expresi některých cytoskeletálních proteinů jako je gliální fibrilární acidický protein (GFAP) a nestin,^{26,27} v akutní fázi podporují vznik zánětu např. produkcí chemokinů¹⁵ a později mají dopad na hojení tkáně produkcí neurotrofických [fibroblastový růstový faktor 2, (fibroblast growth factor 2, FGF2), S100 β]²⁸ ale i inhibičních látek (CSPG).²⁹ Vlivem odumírání oligodendrocytů a zánětlivého prostředí v místě poškození dochází k proliferaci NG2 glií. Určitá část ale zůstává v prekursorovém stádiu a mj. ještě zvýší expresi NG2.^{30,31} Do centra léze migrují také perivaskulární fibroblasty³² a pericyty z poškozených cév, které se mění ve fibroblastům podobné buňky s pozitivní expresí NG2,³³ a oba buněčné typy přispívají ke zjizvení tkáně produkcí kolagenu typu I a fibronektinu.^{32–35}

Důležitou roli v iniciaci tvorby gliové jizvy mají astrocyty. Hromadí se především v centru léze kolem poškozené tkáně a zánětlivých buněk, interagují s dalšími výše zmíněnými buňkami a postupně tvoří neprostupnou chemickou a mechanickou bariéru, která brání dalšímu šíření zánětu.³⁶ Že je vznikající gliová jizva v akutní fázi skutečně nezbytná a protektivní, dokazují experimenty, ve kterých bylo u zvířecích modelů zabráněno jejímu

vzniku, což vedlo k horšímu průběhu hojení SCI, zánět se rozšířil do vzdálenějších míst od centra léze než u kontrolních zvířat a byla poškozena větší plocha tkáně.^{35–38}



Obrázek 2 - Gliová jizva. Buňky tvořící gliovou jizvu a tím vzniklé inhibiční prostředí. Upraveno dle Tran et al.³⁹ (CSPG – chondroitin sulfát proteoglykany, NG2 – neuron-gliální antigen 2).

Na druhou stranu dlouhodobá přítomnost gliové jizvy brání regeneraci nervové tkáně. Bylo pozorováno, že zpočátku přítomné reaktivní astrocyty a později jizvu tvořící astrocyty se liší svou expresí, a tato změna se děje na základě interakce s kolagenem typu I.³⁵ Buňky gliové jizvy produkují zejména v chronické fázi velké množství inhibičních a pro axony repulzivních molekul, z nichž nejvíce zkoumané jsou CSPG, mezi které patří již zmíněný NG2 (jiným názvem CSPG4), ale přítomný je také versican, neurocan, brevican a phosphacan.^{29,40} CSPG mají negativní vliv na růst axonů i na jejich remyelinizaci^{41,42} a jejich štěpení chondroitinázou ABC vede ke zlepšení regenerace u potkaního modelu SCI.⁴³

2.2 Léčba míšního poranění

2.2.1 Současná léčba a prognóza

Současná péče o pacienta s míšním poraněním zahrnuje šetrnou manipulaci, stabilizaci krku a páteře, operaci za účelem dekomprese nebo stabilizace zlomeného fragmentu, léčbu a prevenci systémových následků (např. hemodynamická monitorace, plicní ventilace) a terapii v podobě rehabilitace.⁴⁴ Stále existují kontroverzní témata např. načasování operace a u kterých pacientů ji indikovat, použití steroidních léčiv jako je methylprednisolon nebo kdy a jakým způsobem začít s rehabilitací.⁴⁵

V závislosti na míře poškození dochází u pacientů k určitému spontánnímu zlepšení neurologických funkcí. Prognózu ovlivňuje věk a pohlaví pacienta, etiologie poranění a především úroveň a rozsah míšní léze.⁴⁶ K určení posledního jmenovaného a k hodnocení

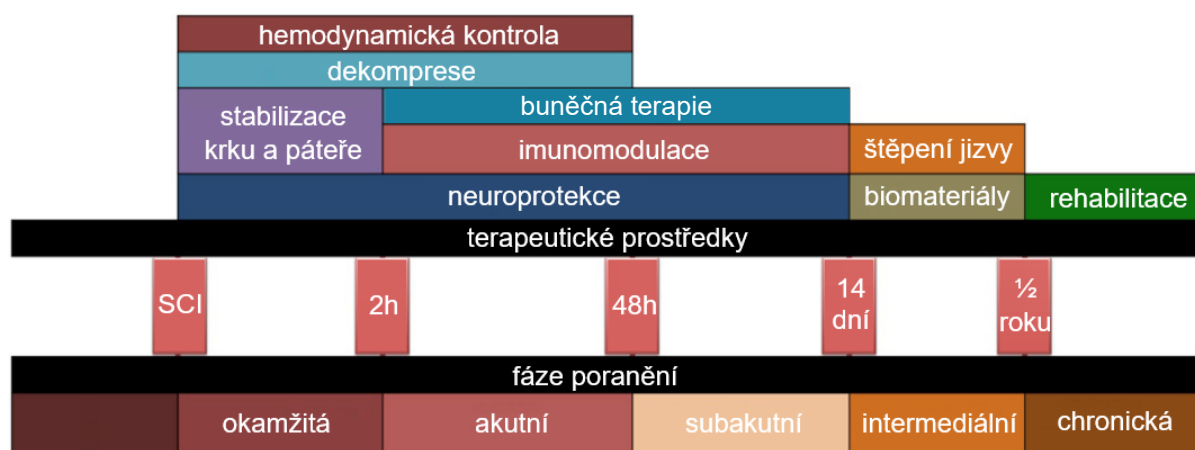
neurologického vývoje v průběhu času se využívá Mezinárodních standardů pro neurologickou klasifikaci míšního poranění (International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury) vytvořených Americkou asociací spinálního poranění (American Spinal Injury Association, ASIA) v roce 1982 s poslední revizí v dubnu 2019.⁴⁷ Součástí tohoto vyšetření je určení rozsahu léze, tedy zda se jedná o lézi kompletní, u které nejsou zachovány žádné funkce pod úrovní léze.⁴⁸ To vyjadřuje škála AIS (ASIA Impairment Scale) se stupni A–E, přičemž stupeň A představuje senzomotoricky kompletní lézi, stupně B–D nekompletní lézi a stupeň E normální sensorické a motorické funkce.⁴⁹ Kompletní léze často vzniká následkem násilných činů a ve srovnání s nekompletní lézí je u ní velmi malá míra spontánního zlepšení.⁴⁶

2.2.2 Experimentální terapie

Při hledání terapeutických látek a procedur, které by pomohly obnovit funkce poraněné míchy, se cílí na zastavení rozvoje nebo zmírnění následků sekundárního poškození (neuroprotektivní terapie) a navození regenerativního prostředí namísto inhibičního (neuroregenerační terapie). Jednotlivé metody cílí na odlišná časová období (většinou subakutní a chronickou fázi), podle toho, který z mechanismů poranění ovlivňují (**Obrázek 3**). Někteří autoři považují za léčebné přístupy s největším klinickým potenciálem buněčné terapie, biomateriály, použití látek štěpících gliovou jizvu a blokujících inhibiční faktory.⁵⁰ Bylo ale navrženo nespočet dalších látek a mnoho z nich již bylo schváleno pro použití v klinických studiích.

Mezi neuroprotektivní látky vyzkoušené v klinických studiích patří např. riluzol,⁵¹ minocyklin,⁵² granulocytární kolonie stimulující faktor (G-CSF)⁵³ a jako neuroprotektivní procedura např. systémová hypotermie.⁵⁴ Ze všech experimentálních terapií se v klinické praxi dostalo nejdále imunosupresivum methylprednisolon, které se na základě výsledků jedné ze studií z 90. let minulého století podává do 8 hodin od vzniku poranění.⁵⁵ Jeho použití je od samého počátku dost diskutované a současně se již spíše nedoporučuje jako součást rutinní péče, protože jeho neuroprotektivní účinky nebyly prokázány a naopak nutná vysoká dávka je asociována s vážnými nežádoucími účinky jakými jsou např. infekce respiračního a urogenitálního traktu nebo sepse.⁵⁶ Riluzol je schválený přípravek pro léčbu neurodegenerativních onemocnění jako je amyotrofická laterální skleróza. Jako blokátor sodíkových kanálů může omezit glutamátovou excitotoxicitu – v prvotní studii došlo u léčených pacientů k výraznějšímu zlepšení neurologických funkcí a AIS skóre než u riluzolem neléčených pacientů.⁵¹ V jiné studii bylo použito antibiotikum minocyklin, jehož

podání mělo neuroprotektivní účinky u zvířecích modelů SCI a onemocnění CNS obecně, u lidských pacientů s SCI ale zatím nebyly prokázány.⁵² G-CSF je cytokin a růstový faktor stimulující k proliferaci neutrofilů, běžně se používá k léčbě neutropenie a jeho neuroprotektivní účinky pozorované u zvířecích modelů SCI se přisuzují zejména modulaci imunitní odpovědi protizánětlivým směrem a podpoře angiogeneze. V klinické studii měl v malé míře pozitivní účinky u většiny pacientů.⁵³



Obrázek 3 - Časová osa aplikace terapeutických látek a metod. Jednotlivé přístupy jsou vhodné pro odlišné fáze poranění dle jejich mechanismu účinku. Upraveno dle Siddiqui et al.⁴⁴ (SCI – poranění míchy).

Odlišnou strategii představují neuroregenerační látky, mezi které patří enzymy štěpící gliovou jizvu, blokátory inhibičních látek, biomateriály přemost'ující míšní lézi, neurotrofní růstové faktory a v neposlední řadě buněčná terapie. Chondroitináza ABC je bakteriální enzym štěpící glykosaminoglykanové řetězce CSPG, které jsou hlavní příčinou inhibičních vlastností gliové jizvy. Při intratekálním podání u potkanů s SCI došlo ke zvýšené expresi proteinu asociovaného s neuroregenerací, konkrétně proteinu asociovaného s růstem 43 (GAP43), a spolu s tím byl pozorován růst funkčně zapojených regenerovaných nervových vláken.⁴³ Komplikací pro klinické použití představuje fakt, že je bakteriálního původu a že její aktivita rychle klesá při teplotě 37 °C, a proto by se musela podávat opakovaně, případně termostabilizovat.⁵⁷ Jedním ze slibných řešení je genová terapie pomocí vektoru s chondroitinázou ABC modifikovanou pro expresi v savčích buňkách, která se zatím ukázala být úspěšná u potkaního modelu.⁵⁸ Jiným způsobem, jak cílit na inhibiční molekuly v prostředí míšní léze, je blokáce signální dráhy zahrnující protein RhoA a Rho kinázu, která je aktivovaná v cílových buňkách po navázání většiny přítomných inhibičních molekul včetně CSPG a NogoA.⁵⁹ V klinické studii byl pacientům během operace po SCI podán enzym

blokující RhoA protein. Terapie byla dobře snášena a vedla ke zlepšení neurologických funkcí zejména pacientů s poraněním v cervikální úrovni.⁶⁰

K podpoře regenerace se také využívají biomateriály, které vyplní prostor míšní léze, vytvoří tím permisivní prostředí a strukturní podporu pro růst nervových vláken a jejich myelinizaci. Jedná se zejména o přírodní i syntetické polymerní hydrogely a pevné nosiče (scaffoldy) lišící se v mnoha parametrech – chemickými a fyzikálními vlastnostmi např. nábojem a velikostí pórů, způsobem polymerace (před aplikací nebo *in situ*), zda jsou biodegradabilní a za jak dlouhou dobu se vstřebají.⁶¹ Biomateriály mohou být také využity jako nosiče růstových faktorů, neurotrofinů, buněk a dalších terapeutických látek, a tím tak kombinovat jejich účinky.^{50,61} V klinických studiích byl již aplikovaný např. kolagenový a chitosan-lamininový nosič oba v kombinaci s kmenovými buňkami,^{62–64} fibrinový gel v kombinaci s acidickým fibroblastovým růstovým faktorem a syntetický kopolymer kyseliny mléčné a glykolové konjugovaný s polylysinem.⁶⁵

Buněčná terapie kombinuje neuroprotektivní a neuroregenerační přístup – v závislosti na použitém buněčném typu je cílem takové terapie nahrazení poškozených buněk a/nebo produkce neurotrofinů a imunomodulačních látek. K tomuto účelu se studuje použití různých druhů kmenových i diferencovaných buněk. Kmenové buňky (stem cells, SCs) jsou nediferencované buňky, které se nacházejí v quiescentním stavu v nikách prakticky po celém těle a v případě potřeby regenerace určité tkáně podstoupí asymetrické dělení, které vede k sebeobnově původní kmenové buňky a k diferenciaci směrem ke zralé cílové buňce. Největší diferenciační potenciál mezi buňkami používanými pro terapie SCI mají pluripotentní embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ESCs), které jsou izolované z vnitřní buněčné masy blastocysty a mohou produkovat buňky všech zárodečných listů – ektodermu, mezodermu a endodermu. Ostatní SCs jsou multipotentní, tedy mohou se diferencovat pouze v omezené množství buněčných typů. Diferenciace SCs poté vede k produkci progenitorových a prekursorových buněk a jejich diferenciační potenciál se postupně snižuje až na jediný buněčný typ.

Pro regeneraci SCI se jako první nabízí použití NSCs, které se nacházejí ve fetálním i dospělém mozku a míše.^{1,2} Odběr NSCs dospělým jedincům pochopitelně není možný a odběr z fetální tkáně přináší etické problémy, navíc je nutné při takové terapii podat pacientovi imunosupresiva.⁴⁴ Stejně překážky vznikají i při využití ESCs spolu s vyšším rizikem nekontrolované proliferace a diferenciaci transplantovaných buněk a s tím spojenou tvorbou teratomu.⁶⁶ Proto je vhodné ESCs před aplikací prediferencovat do určité subpopulace buněk např. v neurální nebo gliové progenitory. U zvířecích modelů se tato

možnost intenzivně studuje, stejně jako použití neurálních progenitorů derivovaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk, což jsou relativně nedávno popsané buňky dospělé tkáně geneticky reprogramované do pluripotentního stavu podobnému ESCs s tím rozdílem, že by díky svému původu nepředstavovaly při transplantaci etický a imunologický problém.⁴⁴ První klinická studie využívající ESCs byla schválená právě pro terapii SCI. Jednalo se o oligodendrocytární prekursorové buňky derivované z ESCs, studie měla zahrnovat 10 pacientů, ale byla v roce 2011 předčasně ukončena z finančních důvodů.⁶⁷ Současně probíhá studie využívající linii míšních NSCs (NSI-566) izolovaných z jediného 8-týdenního plodu (ClinicalTrials.gov, NCT01772810). Předběžné výsledky prvních čtyř pacientů již byly publikované a zatím se zdá být léčba bezpečná.⁶⁸ Alternativní eticky přístupnou a dlouho studovanou možností je transplantace mezenchymálních kmenových buněk, o kterých detailně pojednává kapitola 2.3.

Mimo kmenové a progenitorové buňky byly v klinických studiích použité také Schwannovy buňky,^{69,70} olfaktorické glie (olfactory ensheathing cells, OECs)⁷¹ a aktivované makrofágy.⁷² Schwannovy buňky byly mezi prvními klinicky vyzkoušenými buněčnými typy v terapii SCI, protože mají důležitou roli v regeneraci PNS.⁴ Ve dvou již dokončených studiích byly pacientům transplantovány autologní Schwannovy buňky izolované z lýtkového nervu. Léčba byla uznána bezpečnou a ačkoli bylo u některých pacientů pozorováno zlepšení, množství pacientů bylo malé a studie postrádaly kontrolní skupinu.^{69,70} Fyziologická role OECs zahrnuje celoživotní podporu regenerace čichových neuronů, a proto byly vybrány pro buněčnou terapii SCI v desítce studií.⁷¹ Jednotlivé studie se lišily jednak zdrojem OECs (jednalo se o autologní OECs izolované z čichového bulbu nebo čichové sliznice ale také o fetální buňky), dále byly použité odlišné kultivační protokoly, počet pacientů byl velmi malý, a proto se účinnost terapie zatím těžko vyhodnocuje, zdá se ale být bezpečná.⁷¹ V jednom případě byly pacientům s SCI transplantovány autologní aktivované makrofágy s cílem modifikovat imunitní odpověď protizánětlivým směrem, studie však neprokázala žádné pozitivní účinky této terapie.⁷² Dnes už je zřejmé, že ovlivnění pouze jednoho typu makrofágů nestačí, protože role imunitního systému je mnohem komplexnější.¹⁰

Předchozí výčet samozřejmě není kompletní a neustále jsou navrhovány další nové léčebné přístupy. Jedním z častých závěrů ale zůstává, že do budoucna bude nezbytné zkombinovat více terapeutických metod k dosažení kýženého výsledku.

2.3 Mezenchymální kmenové buňky

2.3.1 Vlastnosti a terapeutický potenciál mezenchymálních kmenových buněk

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSCs) jsou multipotentní kmenové buňky poprvé izolované z kostní dřeně.⁷³ Někteří autoři se o nich zmiňují jako o mezenchymálních stromálních buňkách nebo mezenchymálních progenitorových buňkách, což odráží fakt, že se nejedná o homogenní populaci.⁷⁴ Jako ostatní kmenové buňky jsou charakterizovány schopností sebeobnovy a diferenciací ve více buněčných typů. K tomu musí všechny MSCs splňovat minimální kritéria definovaná International Society of Cellular Therapy, jmenovitě: (i) adherovat k plastovým povrchům; (ii) exprimovat povrchové molekuly (cluster of differentiation, CD) CD105, CD73 a CD90 a být negativní v expresi povrchových molekul CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79 nebo CD19 a HLA-DR; (iii) *in vitro* diferencovat v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty.⁷⁵

Dnes umíme MSCs izolovat nejen z kostní dřeně, ale z různých typů tkání dospělého organismu např. z tukové tkáně,⁷⁶ synoviální tekutiny a membrány,^{77,78} zubní dřeně⁷⁸ a dásně⁷⁹ nebo ze slinných žláz;⁸⁰ a také z extraembryonálních tkání např. z pupečnickové krve,⁸¹ tkáně pupečníku,⁸² placenty⁸³ a plodové vody.^{83,84} Zdá se, že MSCs se vyskytují v podstatě ve všech tkáních a orgánech dospělého organismu, a to zejména perivaskulárně.⁸⁵

Izolace ze snadno dostupných, eticky bezproblémových zdrojů je jen jedním z důvodů, proč jsou MSCs často studovány v souvislosti s terapií různých poruch a onemocnění. V případě poškození nějaké tkáně endogenní MSCs migrují do krevního řečiště, které opouštějí v blízkosti místa poškození stejným mechanismem jako leukocyty, tedy pomocí vazby na selektiny, chemokiny a adhezní molekuly, ačkoli všechny konkrétní zúčastněné molekuly zatím nejsou potvrzeny.⁸⁶ Tohoto efektu, tzv. homingu, lze využít při systémovém podání MSCs, ale bohužel s velkými ztrátami, protože většina buněk se do cílového místa nedostane.⁸⁷ Existuje několik strategií, jak zvýšit účinnost homingu do místa poškození. Můžeme MSCs podat lokálně, tím pádem nemusí buňky migrovat skrze cévy, ale jen následují chemokinový gradient v tkáni. Pokud chceme, např. z důvodů nižší invazivity, podávat MSCs intravenózně, můžeme homing zvýšit naváděním MSCs magnetickými částicemi, zvýšit množství povrchových molekul důležitých pro homing pomocí různých metod (genové inženýrství, enzymaticky, *in vitro* primingem) nebo modifikovat cílovou tkáň (shrnutí v review Ullah *et al.*⁸⁶). Jen málo studií srovnávalo systémové a lokální podání přímo a výsledky se liší u jednotlivých tkání a onemocnění, např. v případě modelu fibrotických jater a zánětu v horní končetině bylo efektivnější lokální podání,^{88,89} v modelu hojení

dentálního implantátu bylo účinnější systémové podání⁹⁰ a při porovnání u modelu hojení zlomenin byly oba způsoby podobně prospěšné.⁹¹

I když je možné MSCs *in vitro* transdiferencovat i mimo buňky mezodermální linie např. v neurony,^{92,93} dnes už se předpokládá, že jejich terapeutický efekt spočívá především v sekreci velkého množství bioaktivních molekul, které napomáhají vzniku regenerativního prostředí. Sekretom MSCs obsahuje látky, které inhibují apoptózu [regulátor apoptózy (B-cell lymphoma 2, Bcl2), survivin), mají antioxidační účinky (staniokalcin 1, hem oxygenáza 1), stimulují angiogenezi [vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), FGF2, hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor, HGF), monocytární chemoatraktantní protein 1, faktor odvozený od stromálních buněk 1), stimulují a atrahují tkáňově specifické progenitorové buňky (např. BDNF, GDNF v případě regenerace CNS) a látky s imunomodulačními účinky [indolamin-2,3-dioxygenáza (IDO), syntetáza oxidu dusnatého 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2), TGFβ, IL10, IL6, HGF, HLA-G5, prostaglandin E2)^{94,95}. Výsledný imunomodulační efekt se ale může lišit, protože MSCs jsou „licencované“ prostředím, ve kterém se nachází, např. zánětlivé faktory v prostředí jako je INFγ, TNFα a IL1 indukují u MSCs protizánětlivé vlastnosti.⁹⁶ Imunomodulace MSCs neprobíhá jen působením solubilních faktorů, ale také pomocí buněčného kontaktu např. inhibicí T lymfocytů vazbou B7-H4 nebo programovanou buněčnou smrtí skrze PD-1 a Fas-ligand/Fas.^{97–99}

Na druhou stranu, velkou překážkou v terapii pomocí MSCs je jejich krátká doba přežívání v místě transplantace při systémovém¹⁰⁰ i lokálním podání.^{101,102} Jednou z příčin by mohla být reakce imunitního systému proti štěpu v případě allogenní transplantace. MSCs byly dlouho považované za neimunogenní díky žádné anebo velmi nízké expresi MHCII a kostimulačních molekul CD40, CD80 a CD86.¹⁰³ Přesto byla pozorována alloreakce *in vivo* u některých zvířecích modelů.^{104–106} Allogenní MSCs byly použity v mnoha klinických studiích, ale jen málo z nich zkoumala imunogenicitu terapie nebo porovnávala účinky autologních a allogenních MSCs. Ve dvou studiích byla měřena tvorba alloprotilátek a byly detekovány pouze u malé části pacientů.^{107,108} Zda k alloreakci dojde, záleží nejspíš na zdroji buněk, podmínkách kultivace, místu transplantace a dalších faktorech. Otázka imunogenicity MSCs tedy není doposud zodpovězená a ani to, jaký má vliv na jejich terapeutický účinek.

Dalším omezením je množství buněk, které musí být získáno pro jednu léčebnou dávku. MSCs se v těle nacházejí v malém množství a musí se nejprve expandovat *ex vivo*, což může trvat několik týdnů a oddaluje to možný začátek terapie. Počet pasáží také ovlivňuje terapeutický potenciál buněk, protože tím narůstá množství senescentních buněk, které mají

sníženou schopnost migrace, antioxidační a imunosupresivní vlastnosti a naopak můžou podpořit rozvoj zánětu.^{109,110} Autologní transplantace omezuje často vysoký věk pacienta, který podobně jako doba kultivace ovlivňuje kvalitu a množství MSCs.^{111–113}

2.3.2 Kondiciované médium

Jedním z možných přístupů, který obchází některé nevýhody buněčné terapie, je transplantace sekretu MSCs v podobě kondiciovaného média nebo extracelulárních váčků. Termín kondiciované médium (KM) představuje v tomto kontextu kultivační médium obohacené o látky produkované buňkami, které v něm byly původně kultivované. Obsahuje tedy široké spektrum bioaktivních molekul, jako jsou cytokiny a růstové faktory, ale také různé typy extracelulárních váčků, které mimo malého množství výše zmíněných molekul obsahují také lipidy, DNA a kódující i nekódující RNA.¹¹⁴ Pro terapeutické účely se zkoumá i použití samotných extracelulárních váčků, přičemž nejvíce studií se zatím soustředí na exozomy a v druhé řadě na mikrovezikuly.¹¹⁴

Výhodou KM oproti buněčné terapii je, že má nižší imunogenní a tumorogenní potenciál, může být snáze uchováváno a transportováno, připraveno ve velkém množství s definovaným složením, a to k okamžitému použití. Konkrétní složení KM je poté ovlivněno mnoha faktory včetně zdroje buněk, věkem, metabolismem a zdravím dárce, kultivačními podmínkami (složení média, teplota, množství kyslíku, biochemické a jiné stimuly) a také způsobem a načasováním izolace (shrnuje v review Phelps *et al.*¹¹⁴). Optimální podmínky musí být určeny zvlášť pro terapii jednotlivých onemocnění a defektů.

2.3.3 Mezenchymální kmenové buňky a jejich sekretom v terapii míšního poranění

V terapii míšního poranění již byly použity v klinických studiích MSCs z kostní dřene (BM-MSCs),^{115–120} z tukové tkáně (AT-MSCs)^{121,122} a z Whartonova rosolu (WJ-MSCs).^{123,124} Na základě výsledků těchto studií se terapie pomocí MSCs ukázala jako bezpečná, a stejně tak v případě léčby jiných neurologických poruch – Alzheimerovy choroby,¹²⁵ Parkinsonovy choroby,^{126–128} amyotrofické laterální sklerózy,^{129–131} roztroušené sklerózy^{132–134} a mozkové příhody.^{135–137}

Odpověď na účinnost terapie je složitější. Zatím proběhnuvší studie se soustředily zejména na zhodnocení bezpečnosti a některé zahrnovaly příliš malé množství pacientů nebo nebyly kontrolované.^{118–123} Čtyři z výše zmíněných studií měly jako kontrolní skupinu zahrnuté pacienty, kteří podstoupili pouze obvyklé rehabilitace. Ve dvou studiích dosáhli pacienti léčení MSCs lepších výsledků než kontrolní skupina, což bylo hodnoceno pomocí

ASIA skóre, elektromyografie nebo testů funkce močového měchýře.^{117,124} Ve zbylých případech bylo zlepšení statisticky neprůkazné¹¹⁶ anebo vůbec nebylo pozorováno.¹¹⁵

Aplikace sekretomu MSCs pro léčbu SCI je zatím omezená pouze na zvířecí modely. Byly již pozorovány terapeutické účinky extracelulárních váčků^{138,139} a KM připraveného z BM-MSCs^{140–142} nebo MSCs izolovaných z dentální pulpy.¹⁴³ V těchto případech byl ale účinek sekretomu porovnán s buněčnou terapií jen nepřímo na základě předchozích výsledků.

Ačkoli se většina prací zaměřovala na BM-MSCs, výsledky různých studií ukazují, že WJ-MSCs a obecně buňky ze zárodečných tkání jsou vhodnější pro terapii poruch nervové soustavy než buňky z dospělé tkáně.^{93,144–146} Ve srovnání s BM-MSCs a AT-MSCs, WJ-MSCs snáze diferencují v neurální prekursorové buňky a také produkují více neurotrofních růstových faktorů a dalších látek spojených s regenerací nervové soustavy. Srovnání bylo provedeno pomocí analýzy transkriptomu^{144,145} i sekretomu^{93,146} (Obrázek 4).

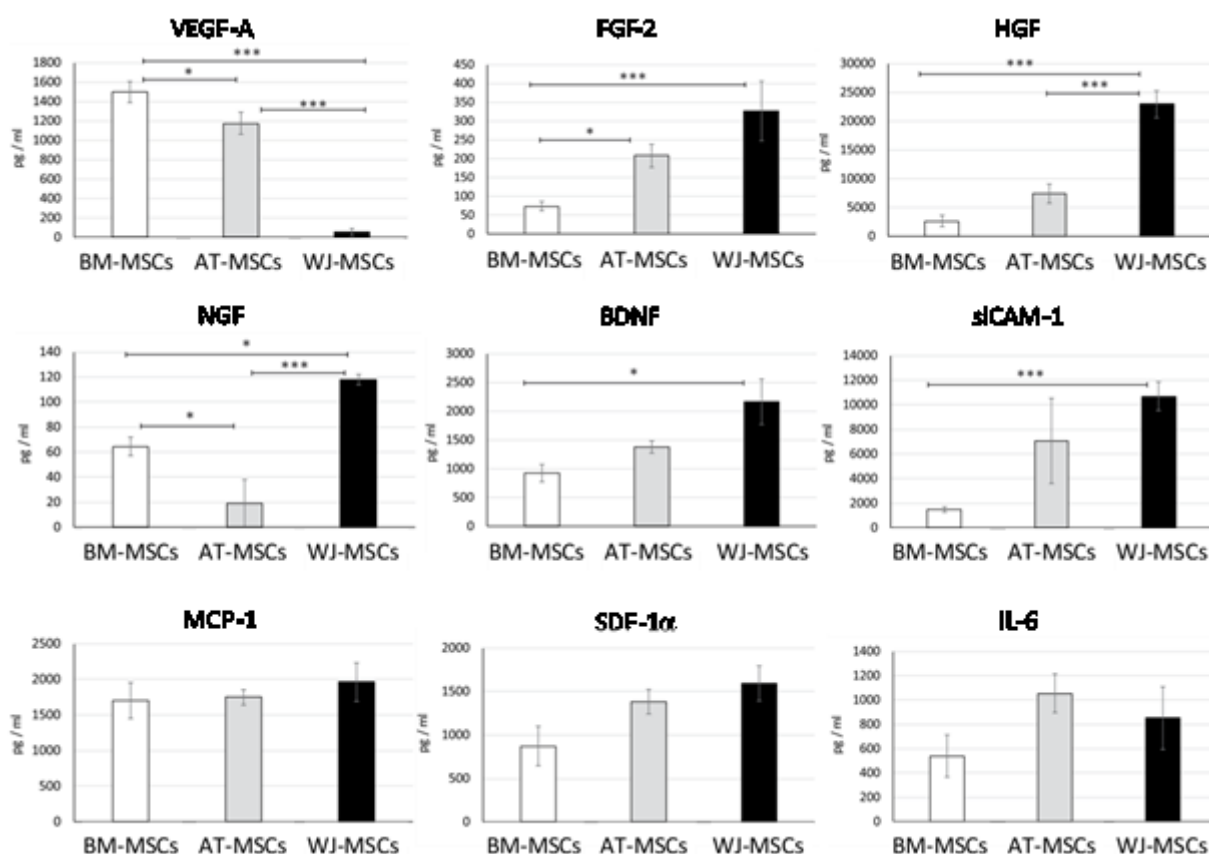
Podle jedné studie také WJ-MSCs více exprimují geny spojené s adhezí, proliferací a regulací imunitního systému.¹⁴⁴ Pravděpodobně tomu přispívá to, že WJ-MSCs pocházejí z primitivnější tkáně a kombinují tak vlastnosti dospělých MSCs a pluripotentních ESCs. Oproti dospělým MSCs mají vyšší expresi některých genů považovaných za markery pluripotence také exprimují geny asociované s endodermální linií, ektodermální linií a s neuronálním vývojem.¹⁴⁷ Vedlejší výhodou je, že se získání buněk obejde bez bolestivé procedury, jakou je odběr kostní dřeně.

2.3.4 Whartonův rosol jako zdroj mezenchymálních kmenových buněk

Whartonův rosol (Wharton's jelly, WJ) je pojivová želatinózní tkáň pupečníku popsaná Thomasem Whartonem v roce 1656. Stavba pupečníku u jednotlivých savců se liší. Lidský pupečník má v době porodu délku kolem 50 cm a šířku 1–2 cm. Skládá se ze dvou tepen a jedné žíly, obalených a chráněných WJ a vnější vrstvy zárodečného obalu amnionu. Jsou v něm pouze tyto 3 cévy a není inervovaný. Odlišností lidských pupečnickových cév je také chybějící vnější vrstva *tunica adventitia*, jejíž podpůrnou funkci zřejmě nahrazuje WJ. Samotná tkáň Whartonova rosolu je tvořena zejména kolagenními vlákny a z buněk jsou přítomné myofibroblasty a jejich různá prekursorová stádia až nediferencované MSCs. (Shrnuto v review Davies *et al.*¹⁴⁸).

Na základě struktury může být tkáň pupečníku rozdělena do několika oblastí – cévy, perivaskulární oblast, vnitřní WJ, subamnionová a amnionová oblast. V jednom detailním srovnání buněk z jednotlivých oblastí WJ se ukázalo, že ačkoli se nejvíce buněk nachází v perivaskulární oblasti, klinicky nejrelevantnější využití mají buňky z vnitřní části WJ.¹⁴⁹

WJ-MSCs lze izolovat pomocí enzymatické digesce nebo explantátovými kulturami, v obou případech existují protokoly, které využívají pouze některou z částí pupečníku nebo celou tkáň.¹⁴⁹ Někteří autoři blíže nespecifikují metodu izolace a nazývají použité buňky pouze jako MSCs izolované z pupečníku (umbilical cord-MSCs). Druhým problémem je, že existují odlišnosti v nomenklatuře WJ a v určení tloušťky jednotlivých částí.¹⁴⁸ To vše ztěžuje porovnání jednotlivých preklinických a klinických studií a odráží to skutečnost, že mají WJ-MSCs analyzované jednotlivými výzkumnými skupinami odlišné vlastnosti.



Obrázek 4 – Odlišný sekretom jednotlivých druhů MSCs. WJ-MSCs produkují nejvíce neurotrofních faktorů jako jsou FGF2, HGF, NGF, BDNF a zároveň se od ostatních MSCs výrazně neliší v produkci cytokinů a chemokinů. Převzato z Petrenko et al.¹⁴⁶ (BDNF – mozkový neurotrofní růstový faktor, FGF-2 – fibroblastový růstový faktor 2, HGF – hepatocytární růstový faktor, IL-6 – interleukin 6, MCP-1 – monocytární chemoatraktantní protein 1, NGF – nervový růstový faktor, SDF-1α – faktor odvozený od stromálních buněk 1α, sICAM1 – solubilní intercelulární adhezní molekula 1, VEGF A – vaskulární endoteliální růstový faktor A).

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo vyhodnotit a porovnat terapeutické účinky lokální aplikace lidských WJ–MSCs a jejich sekretu v podobě kondiciovaného média na regeneraci experimentálního míšního poranění u potkanů. Za tímto účelem byl analyzovaný stav léčených jedinců a rozdíly mezi jednotlivými skupinami v oblastech:

- motorických a senzorických funkcí,
- morfologické stavby poraněné tkáně,
- relativní genové exprese.

4 Materiály a metody

Použité metody byly popsány také v publikovaném článku (příloha 9.1). Operaci vedoucí ke vzniku míšního poranění a aplikaci léčivých látek lumbální punkcí prováděli kolegové z laboratoře zkušeni v těchto úkonech. Histologické vzorky byly barveny v laboratoři fakultní nemocnice Motol.

4.1 Zvířata

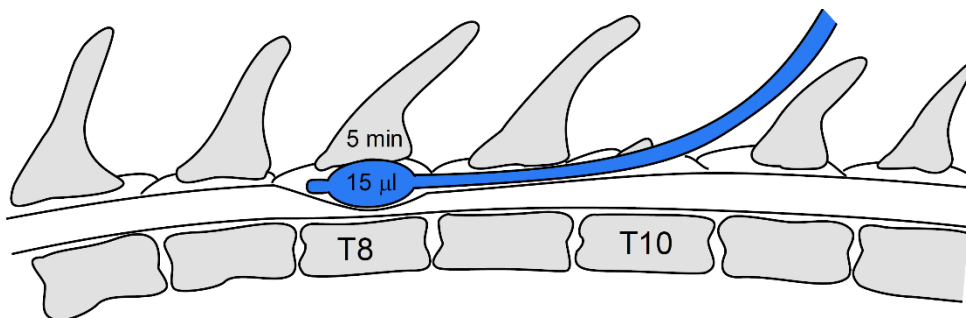
V experimentech byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar získaní z chovů společnosti Velaz, Česká republika. Byli vybráni jedinci s podobnou vahou 250–300 g z důvodu snížení rizika vzniku odlišně velkých míšních lézí. Byli chováni v klecích po dvou v režimu 12/12 hod střídání světla a tmy. Po celou dobu experimentu měli přístup k vodě a potravě *ad libitum*.

4.2 Model míšního poranění

K navození experimentálního poranění míchy byl zvolen model kompresní ischemické balonkové léze, konkrétně modifikace popsaná Vanickým *et al.*¹⁵⁰ (Obrázek 5).

Před operací byla zvířata uvedena do celkové anestezie isofluranem (Forane; Abbott Laboratories, UK) a analgezie byla navozena subkutánní injekcí buprenorfinu (0,05–0,1 mg/kg; Orion Pharma, ČR). Pro účely antimikrobiální profylaxe byl intramuskulárně injikován gentamicin sulfát (5 mg/kg, Lek Pharmaceuticals, Slovinsko).

Během operace byl přiváděn maskou 3,5% isofluran s rychlostí průtoku 0,3 l/min a tělesná teplota byla udržována na 37 °C pomocí vyhřívací podložky. Podél páteře v hrudní oblasti byla nastřížena kůže, odsunuty paravertebrální svaly od thorakálních obratlů T7–T12 a byla provedena laminektomie (odstranění zadního oblouku obratle) T10. Fogartyho katetr (průměr 2 French) byl vsunut do epidurálního prostoru tak, aby se balonek nacházel v oblasti obratle T8. Balonek byl nafouknut 15 μ l fyziologického roztoku a ponechán v daném místě



Obrázek 5: Schéma provedení experimentálního poranění míchy. Po laminektomii obratle T10 byl do epidurálního prostoru vsunut katetr a nafouknut balonek působící stlačení a ischemii míšní tkáně v okolí hrudního obratle T8. Upraveno dle Vanický *et al.*¹⁵⁰

po dobu 5 minut. Poté byl balónek rychle vyfouknut, katetr vyjmut, svaly a kůže sešity po anatomických vrstvách jednotlivými nevstřebatelnými stehy. Následujících 7 dní byl potkanům podáván gentamicin sulfát (5 mg/kg) a bylo prováděno manuální vyprazdňování močového měchýře, dokud nebyli schopni vyprazdňování samostatně.

4.3 Izolace, kultivace WJ-MSCs a příprava KM

Postupy včetně použitých materiálů jsou podrobně popsány v publikovaném článku (příloha 9.1). Stručně: pupečníky byly získány od dárkyň po přirozeném porodu zdravých donošených novorozenců. Z pupečníku byly odstraněny cévy a WJ-MSCs byly izolovány enzymatickou digescí zbylé tkáně. Poté byly kultivovány při 37 °C a 5% CO₂ v alfa minimálním esenciálním médiu obohaceném 5% destičkovým lyzátem a gentamicinem. Pro transplantaci a přípravu kondiciovaného média byla použita 3. pasáž WJ-MSCs. Do nových kultivačních lahví bylo přeneseno 5×10^3 buněk/cm², původní médium bylo vyměněno za alfa minimální esenciální médium obohacené kombinací látek inzulin-transferin-selen. Po 24 hod kultivace byly WJ-MSCs odebrány, spočítány a KM bylo koncentrováno k dosažení koncentrace ekvivalentní produkci 1,5 mil buněk/50 µl. Jako kontrolní nekondiciované médium (nkM) bylo použito stejné kultivační médium, které bylo použito pro přípravu KM včetně dodržení stejných kultivačních podmínek.

Aplikované WJ-MSCs a jejich KM byly zároveň použité v souvisejících projektech laboratoře. Buňky z 3. pasáže byly charakterizované pomocí průtokové cytometrie a splňovaly kritéria definovaná International Society of Cellular Therapy popsané v kapitole 2.3.1., jak je ukázáno v předchozím článku laboratoře.¹⁰² Složení KM bylo zjištěno pomocí ProcartaPlex® imunoanalýzy založené na Luminex® metodě popsané v článku v příloze 9.1. Výsledek složení KM ukazuje **Obrázek 6**.

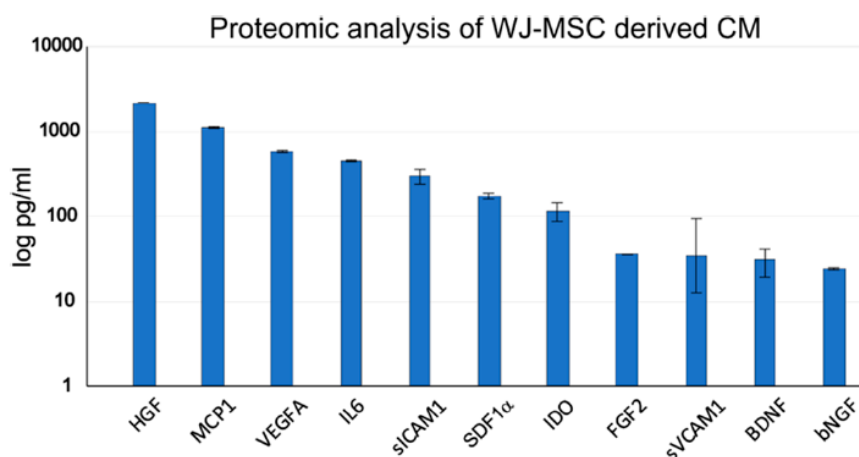
4.4 Proces léčby

Po provedené operaci byli jedinci rozděleni do čtyř skupin, kterým byla podána jedna z následujících látek:

- 1,5 mil WJ-MSCs v 50 µl fosfátového pufru (phosphate-buffered saline, PBS),
- KM koncentrované na ekvivalent produkce 1,5 mil buněk/50 µl,
- 50 µl nkM,
- 50 µl fyziologického roztoku pro neléčenou kontrolní skupinu.

Léčivá nebo kontrolní látka byla aplikována ve třech stejných dávkách jeden, dva a tři týdny od operace, a to intratekálně pomocí lumbální punkce mezi obratli L4 a L5 jehlou 25 G

pod krátkodobou celkovou anestezií popsanou ve 4.2. Pro zabránění opětovného nasátí obsahu byla jehla ponechána v místě injikování po dobu 30 s.



Obrázek 6 - Složení KM. Výsledek proteomické analýzy KM odvozeného od WJ-MSCs použitého v diplomové práci jako studovaná terapeutická látka. Převzato z článku – příloha 9.1. (**BDNF** – mozkový neurotrofní faktor, **bNGF** – bazický nervový růstový faktor, **FGF2** – fibroblastový růstový faktor 2, **HGF** – hepatocytární růstový faktor, **IDO** – indolamin-2,3-dioxygenáza, **IL6** – interleukin 6, **MCP1** – monocytární chemoatraktantní protein 1, **SDF1α** – faktor odvozený od stromálních buněk 1α, **sICAM1** – solubilní intercelulární adhezní molekula 1, **sVCAM1** – solubilní vaskulární adhezní molekula 1, **VEGF A** – vaskulární endoteliální růstový faktor A)

4.5 Behaviorální testování

Ke zhodnocení lokomotorických a senzorických funkcí byly použity vybrané behaviorální testy. Během jednoho týdne před SCI operací proběhlo předtestování: opakované provedení behaviorálních testů s cílem habitualizace jedinců a naučení provádění složitějších úkonů jako je chůze v beam walk testu, a dále získání předoperačních údajů. Ve výsledcích je toto časové období uváděno jako –1. týden.

Testování během samotného experimentu začalo v 1. týdnu od operace v případě BBB a plantar testu, a ve 3. týdnu v případě beam walk testu. Všechny testy byly opakovány jednou týdně (s výjimkou beam walk testu, popsáno níže) až do 9. týdne od operace.

4.5.1 BBB test

Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) test pojmenovaný po svých tvůrcích představuje standardizovaný způsob hodnocení pohybu a chůze potkanů. BBB stupnice je složená z hodnot 0–21, kde 0 představuje úplnou paralýzu zadních končetin a 21 pohyb zdravého zvířete, přičemž pro každý stupeň je přesně definovaný možný pohyb kloubů, přenášení váhy na zadní končetiny, koordinace předních a zadních končetin při chůzi, pozice tlapy při dopadu a zvednutí a celková stabilita těla.¹⁵¹

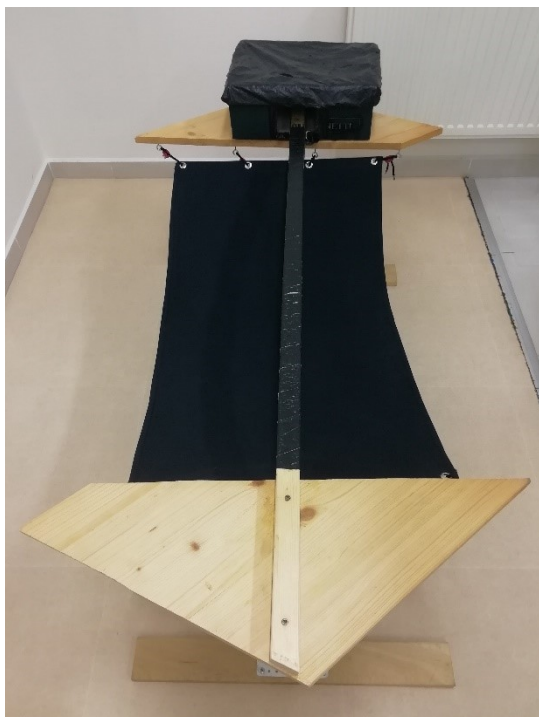
Potkani byli umístěni po jednom do obdélníkového prostoru na zemi ohraničeného kartovými stěnami. Poté byli cca 4 min pozorováni při volném pohybu a v případě delší doby

nečinnosti byli povzbuzeni k pohybu zaťukáním nebo zaškrábáním na odlehlou stěnu kartonu. Každá zadní končetina byla hodnocena zvlášť a výsledné BBB skóre bylo spočítáno jako průměr těchto dvou hodnot.

4.5.2 Beam walk test

Pomocí beam walk testu (testu chůze na kladině) byly hodnoceny motorické funkce, koordinace končetin a udržení rovnováhy se zaměřením na zadní končetiny. Potkani byli umístěni na začátek 1 m dlouhé a 3,4 cm úzké obdélníkové kladiny, na jejímž konci je umístěná krabice sloužící jako skrýš a motivace přejít kladinu. Pod kladinou se nachází záchranná síť pro případ pádu zvířete dolů (**Obrázek 7A**). Pohyb zvířat po kladině byl nahráván kamerovým systémem sledujícím pohyb (TSE-Systems Inc., Německo). Automaticky byla zaznamenána doba potřebná k dosažení cíle na konci kladiny (beam walk čas) s maximem 60 s, kdy bylo nahrávání zastaveno, i když potkan do cíle nedošel. Vedle toho byla na základě nahrávek posouzena motorická koordinace končetin pomocí škály s hodnotami 0–7 (beam walk skóre, **Obrázek 7B**) v podobě převzaté od L. Goldsteina.¹⁵² V předtestovacím týdnu potkani nejprve opakovaně prováděli chůzi po kladině, dokud nepochopili požadovaný úkon, až poté byla jejich chůze na kladině měřena. Beam walk test byl prováděn třikrát týdně ve dvou opakováních za den a těchto šest hodnot bylo pro daný týden zprůměrováno.

A



B

Hodnota	Význam
1	Potkan není schopen položit postižené zadní končetiny na povrch kladiny.
2	Položí postižené zadní končetiny na povrch kladiny, udrží rovnováhu, ale není schopen kladinu přejít.
3	Přejde kladinu způsobem, kdy za sebou zadní končetiny vleče.
4	Přejde kladinu a během toho jednou položí zadní končetinu na povrch kladiny.
5	Přejde kladinu a během toho používá zadní končetiny v méně než polovině kroků.
6	Přejde kladinu a během toho používá zadní končetiny ve více než polovině kroků.
7	Přejde kladinu s maximálně dvěma sklouznutími zadních končetin z kladiny.

Obrázek 7 - Beam walk test. (A) Fotografie aparátu používaného k provedení beam walk testu. (B) Tabulka vysvětlující význam hodnot beam walk skóre.

4.5.3 Plantar test

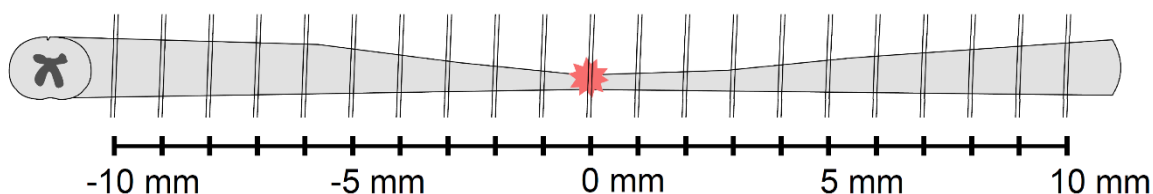
Jako senzorický test byl zvolený test citlivosti na teplo známý také jako plantar test. Byla použita varianta testování využívající komerčně dostupný standardizovaný aparát pro plantar test (Ugo Basile, Itálie). Aparát se skládá z oddělených částečně průhledných boxů, které znemožňují zvířatům vidět do sousedního boxu, což je udržuje v klidu. Pod průhlednou podlahou je umístěno pohyblivé zařízení s infračervenou lampou a vyznačeným křížkem v místě zdroje záření.

Potkani byli umístěni do boxů a měření bylo zahájeno poté, co se aklimatizovali a přestali prozkoumávat nové prostředí (přibližně 5 min). Lampa byla umístěna pod tlapku měřené zadní končetiny, generátor infračerveného záření byl zapnut, přístroj měřil čas a automaticky se zastavil po zaznamenání odtažení tlapky na základě tepelného bolestivého stimulu. Každá končetina byla stimulována pětkrát, pokaždé na stejném místě ale s dostatečnými časovými odstupy mezi jednotlivými měřeními. Nejvyšší a nejnižší hodnota byla vyřazena z analýzy a výsledná hodnota byla spočítána jako průměr zbylých šesti hodnot pro obě tlapky. Latence odtažení tlapky u zdravých potkanů je obvykle 8–12 s. Výrazné snížení tohoto času znamená hyperalgesii.¹⁵³

4.6 Histologická analýza

Po devíti týdnech od vzniku SCI byly potkani usmrceni během celkové anestezie vyvolané směsí ketaminu (100 mg/kg) a xylazinu (20 mg/kg). Poté byl otevřen hrudní koš, odhaleno srdce a provedena transkardiální perfuze nejdříve PBS k odstranění krve z oběhu a poté fixačním roztokem (4% paraformaldehyd v 0,1 M PBS). Z těla byla odebrána páteř, která byla před vyjmutím míchy z páteřního kanálu dále fixována ve výše zmíněném roztoku přes noc při 4 °C. Pro přípravu histologických řezů byla tkáň míchy zalita do parafinu a nakrájena na mikrotomu na 5 µm tenké transversální řezy. Podle tvaru míchy bylo přibližně určeno centrum léze a řezy byly zhotoveny v 1mm intervalech 10 mm kraniálně a kaudálně od odhadovaného centra (**Obrázek 8**). Vzorky z každého milimetrového segmentu byly získány ve čtyřech sadách pro jednotlivá histologická barvení a také pro analýzu genové exprese. Po nabarvení byly analyzovány pomocí mikroskopu Axioskop 2 plus (Zeiss, Německo) a softwaru ImageJ (NIH, USA), nebo v případě analýzy GAP43 pomocí mikroskopu LEICA CTR6500 a softwaru TissueQuest (obojí od TissueGnostics, Rakousko).

Pro analýzu zachované míšní tkáně byly vzorky barveny kresolovou violetí v kombinaci s luxolovou modří (luxol fast blue; obojí od Sigma-Aldrich, USA). Pomocí softwaru ImageJ byla spočítána plocha zachované šedé a bílé hmoty v jednotlivých řezech. Jako centrum léze



Obrázek 8 – Schéma přípravy transversálních řezů míchy.

byl určen segment s nejmenším množstvím zachované tkáně. Vzorky jednotlivých skupin byly porovnány v oblasti centra léze a sedmi řezech kraniálním a kaudálním směrem.

Astroglióza a velikost gliové jizvy byla hodnocena pomocí imunofluorescenčně barvených vzorků protilátkou proti GFAP konjugovanou s indotrimethinecyaninem (Sigma). Pomocí softwaru ImageJ byla změřena plocha gliové jizvy kolem centrální kavity a počet protoplazmatických astrocytů na jednotlivých vzorcích z centra léze a pěti řezech kraniálním a kaudálním směrem.

Pro analýzu nově rostoucích vláken (axonal sprouting) bylo použito imunofluorescenční barvení pomocí primární protilátky proti GAP43 (Millipore, USA) v kombinaci se sekundární kozí protilátkou proti myším IgM (1:200; Merck-Millipore, Německo). Mikroskopické snímky byly analyzovány softwarem TissueQuest, ve kterém byly manuálně spočítány GAP43⁺ vlákna v jednotlivých řezech z centra léze a pěti segmentech kraniálním směrem. Výsledky z těchto řezů byly zprůměrovány. Kaudální segmenty nebyly do analýzy zahrnuty z důvodu nedostatečného množství kvalitních řezů pro jednotlivé skupiny.

4.7 Analýza genové exprese

Tato analýza se skládala z několika kroků: izolace RNA produkované buňkami z centra léze, její reverzní transkripce do komplementární DNA (cDNA) a kvantitativní real time PCR (RT-qPCR). Vybrány byly následující geny: kódující C-C chemokinové ligandy 3 a 5 (*Ccl3*, *Ccl5*), markery fenotypu makrofágů/mikroglíí [interferon regulující faktor 5 (*Irf5*), manózoový receptor C-tytu 1 (*Mrc1*), *Cd86*, *Cd163*], další látky spojené s imunomodulací (interleukiny *Il2*, *Il10*, *Il1b* a *Il6*, *Tnfa*, *Nos2*, nukleární faktor kappa B (*Nfkb*)], ovlivňující neuroregeneraci [*Gap43*, *Fgf2*, *Vegfa*, *Cntf*, *Gfap*, *Cspg4*] a apoptózu [*Bcl2*, kaspáza 3 (Caspase 3, *Casp3*)]. Vyjádřena byla relativní genová exprese s využitím glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (*Gapdh*) jako referenčního genu.

Vzorky míšní tkáně z centra léze zvířat usmrcených ve 4. týdnu od SCI byly uchovány v roztoku RNeasy Lysis Solution (Qiagen od Thermo Fisher Scientific, USA) při teplotě

–80 °C a RNA byla izolována pomocí soupravy RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Německo) podle návodu výrobce.

Pro izolaci RNA z tkáně zvířat usmrcených v 9. týdnu od SCI byly využity řezy z parafrinového bloku pocházející z 4–5 segmentů okolo centra léze, které bylo určené pomocí histologické analýzy zachované tkáně (kapitola 4.6). RNA byla izolována pomocí soupravy RNeasy® FFPE Kit (Qiagen, Německo) podle návodu výrobce s využitím volitelného kroku DNA purifikace.

Odtud byl postup pro vzorky ze 4. a 9. týdne stejný. Množství a čistota izolované RNA byla změřena spektrofotometricky přístrojem NanoPhotometer® P330 (Implen, Německo). Pro výpočet koncentrace RNA přístroj využívá Lambertův-Beerův zákon a naměřenou absorbanci vzorku při 260 nm. Izolovaná RNA byla považována za dostatečně čistou, pokud se poměr absorbancí A260/A280 rovnal 1,8–2,1.

K reverzní transkripci do cDNA byla použita souprava Transcriptor Universal cDNA Master (Roche, Švýcarsko), která obsahuje všechny potřebné reagenty (primery ve formě směsi náhodných hexanukleotidů, nukleotidy, pufr a enzymy), a přístroj T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, USA).

Při přípravě reakční směsi pro RT-qPCR reakci byly použity vzorky cDNA, master mix FastStart Universal Probe Master (Roche, Švýcarsko) a jednotlivé sady hydrolizačních sond a primerů TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies od Thermo Fisher Scientific, USA), které jsou uvedeny v **Tabulka 1**. Výsledný objem reakční směsi 10 µl obsahoval cDNA ekvivalentní 65 ng izolované RNA.

Tabulka 1 – Použité TaqMan eseje.

Název genu	ID výrobce		
<i>Bcl2</i>	Rn99999125_m1	<i>Gfap</i>	Rn00566603_m1
<i>Casp3</i>	Rn00563902_m1	<i>Il10</i>	Rn01483988_g1
<i>Ccl3</i>	Rn01464736_g1	<i>Il1b</i>	Rn00580432_m1
<i>Ccl5</i>	Rn00579590_m1	<i>Il2</i>	Rn00587673_m1
<i>Cd163</i>	Rn01492519_m1	<i>Il6</i>	Rn01410330_m1
<i>Cd86</i>	Rn00571654_m1	<i>Irf5</i>	Rn01500522_m1
<i>Cntf</i>	Rn00755092_m1	<i>Mrc1</i>	Rn01487342_m1
<i>Cspg4</i>	Rn00578849_m1	<i>Nfkb</i>	Rn01399572_m1
<i>Fgf2</i>	Rn00570809_m1	<i>Nos2</i>	Rn00561646_m1
<i>Gap43</i>	Rn01474579_m1	<i>Tnfa</i>	Rn01525859_g1
<i>Gapdh</i>	Rn01775763_m1	<i>Vegfa</i>	Rn01511601_m1

Samotná RT-qPCR reakce proběhla v real time PCR cycleru (StepOnePlus™, Life Technologies, USA) za stejných podmínek pro všechny vzorky: 2 min při 50 °C, 10 min při 95 °C a následně 40 cyklů skládajících se z 15 s při 95 °C a 1 min při 60 °C.

Získané výsledky byly analyzovány v programu StepOnePlus® verze 2.3 (Life Technologies, USA). K výpočtu relativní genové exprese byla použita $\Delta\Delta C_t$ metoda. C_t hodnota (cycle of threshold, cyklus prahu) uvádí číslo cyklu, kdy nastal pro daný gen nárůst fluorescence nad práh pozadí (reakce proběhly pro každý vzorek v dubletech, bylo tedy počítáno s průměrnou hodnotou C_t). Hodnota ΔC_t představuje rozdíl mezi expresí zkoumaného genu a referenčního genu (*Gapdh*). Porovnáním hodnot ΔC_t vzorku léčené skupiny a ΔC_t vzorku neléčené kontrolní skupiny byla získána informace, kolikanásobně se exprese daného genu u těchto dvou skupin liší.

4.8 Statistická analýza

Pro statistickou analýzu dat byl použitý program SigmaPlot verze 13 (Systat Software Inc., USA). Data ve všech grafech jsou prezentována jako průměry \pm střední chyba průměru.

Výsledky behaviorálních testů byly vyhodnoceny pomocí statistického testu dvoufaktorová (two-way) ANOVA RM (Analysis of variance repeated measures, analýza rozptylu opakovaná měření) s post-hoc mnohonásobným porovnáním pomocí Studentovy-Newmanovy-Keulsovy metody. Za signifikantní byly považovány hodnoty $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

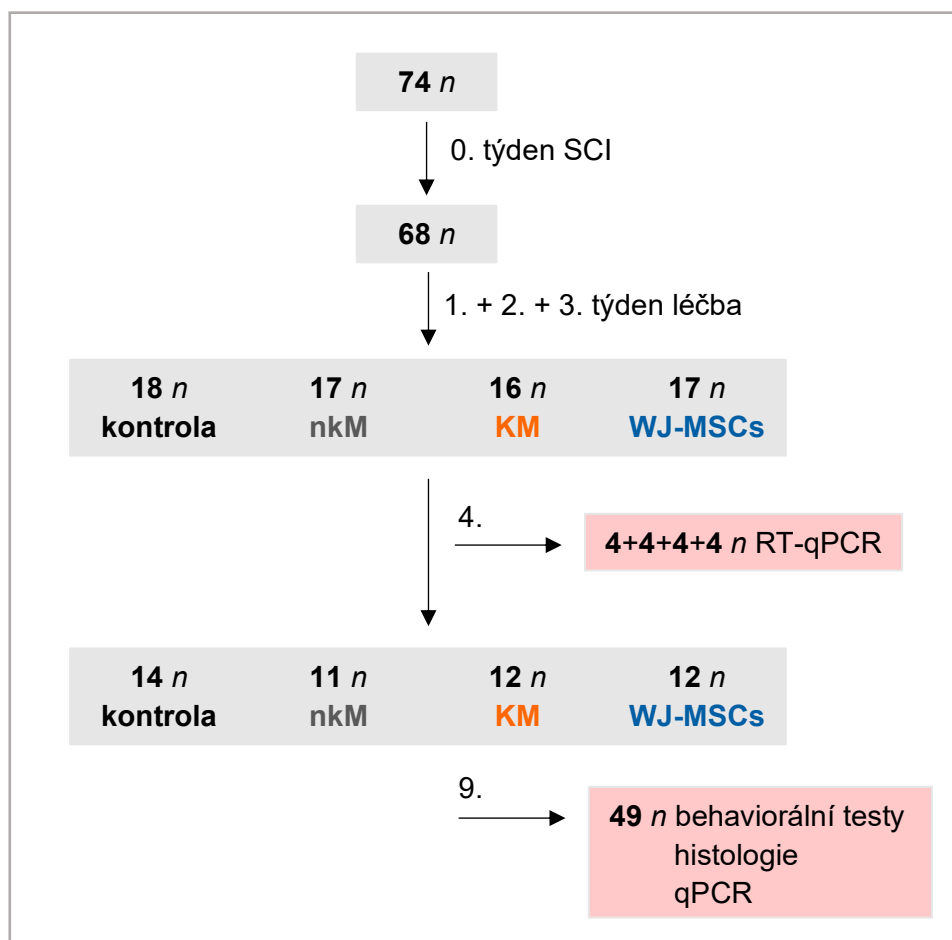
Data z analýzy genové exprese a všech částí histologické analýzy byla vyhodnocena pomocí testu jednofaktorová (one-way) ANOVA s post-hoc mnohonásobným porovnáním Studentovou-Newmanovou-Keulsovou metodou. Za signifikantní byly považovány hodnoty $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

5 Výsledky

5.1 Provedení operace a aplikace léčebných látek

Do experimentu bylo postupně zahrnuto 74 potkanů. Se všemi zvířaty bylo zacházeno podle stejného schématu (Obrázek 9): 1., 2. a 3. týden po vzniku SCI byla potkanům aplikována dávka jedné z léčebných látek (nkM, KM, WJ-MSCs) nebo fyziologický roztok v případě kontrolní skupiny. Z toho 16 zvířat bylo usmrceno 4. týden od SCI pro vyhodnocení krátkodobé změny genové exprese a zbylá zvířata přeživší do 9. týdne byla použita k vyhodnocení behaviorálních testů, histologické a dlouhodobé RT-qPCR analýzy.

Operace, při které bylo u potkanů vyvoláno SCI, proběhla úspěšně u 68 zvířat ze 74 operovaných. Další tři jedinci uhynuli během následujících týdnů po rozdělení do skupin (dva byli utraceni z důvodu infekce ledvin a atrofické rány na boku, jeden uhynul během anestezie podané pro aplikaci 1. dávky léčivé látky).



Obrázek 9 – Schéma experimentu. Po týdnu behaviorálního předtestování proběhla operace vedoucí k SCI, při které uhynulo 6 jedinců. Poté byla zvířata rozdělena do 4 skupin, z nichž každé byla dána 1., 2. a 3. týden dávka odlišné léčivé látky. Ve 4. týdnu bylo usmrceno 16 zvířat pro RT-qPCR analýzu, zbylá zvířata usmrcená v 9. týdnu byla využita k analýze behaviorálních testů, histologii a RT-qPCR.

(KM – kondicionané médium, nkM – kontrolní médium, SCI – poranění míchy, WJ-MSCs – mezenchymální kmenové buňky izolované z Whartonova rosolu).

5.2 Behaviorální testování

5.2.1 BBB test

Pomocí lokomotorického BBB testu byl hodnocen rozsah pohybu zadních končetin (**Obrázek 10A**). První týden od vzniku míšního poranění a zároveň po aplikaci první léčebné dávky byl pozorovaný největší rozdíl mezi jednotlivými skupinami. Většina neléčených zvířat měla skóre 0 (úplná paralýza), zatímco skupiny léčené nkM a WJ-MSCs měly průměrné skóre 2 a v případě léčby KM skóre 4. Od této doby až do konce experimentu byl značný rozdíl mezi neléčenou kontrolou a ostatními třemi léčenými skupinami, ale rozdíl mezi léčenými skupinami navzájem nebyl signifikantní.

Během 2. a 3. týdne nastalo nejvýraznější zlepšení u všech skupin, které se již v dalších týdnech příliš neměnilo. Neléčená skupina dosáhla v průměru skóre 4 (1–7,5), její pohyb tedy zůstal omezený na první část stupnice – pohyb kloubů a případně tzv. zametání (sweeping), ale bez přenášení váhy na zadní končetiny. Ostatní tři léčené skupiny dosáhly průměrného skóre 7 nebo 8 (4–15), což znamená, že někteří z potkanů v těchto skupinách byli schopni kroků s přenášením váhy na zadní končetiny s odlišnou mírou koordinace předních a zadních končetin.

5.2.2 Beam walk test

V beam walk (BW) testu byly měřeny motorické funkce a koordinace končetin při chůzi pomocí dvou parametrů – času potřebného k přejití 1 m dlouhé kladiny (**Obrázek 10C**) a míra zapojení zadních končetin při této chůzi vyjádřená jako BW skóre (**Obrázek 10D**).

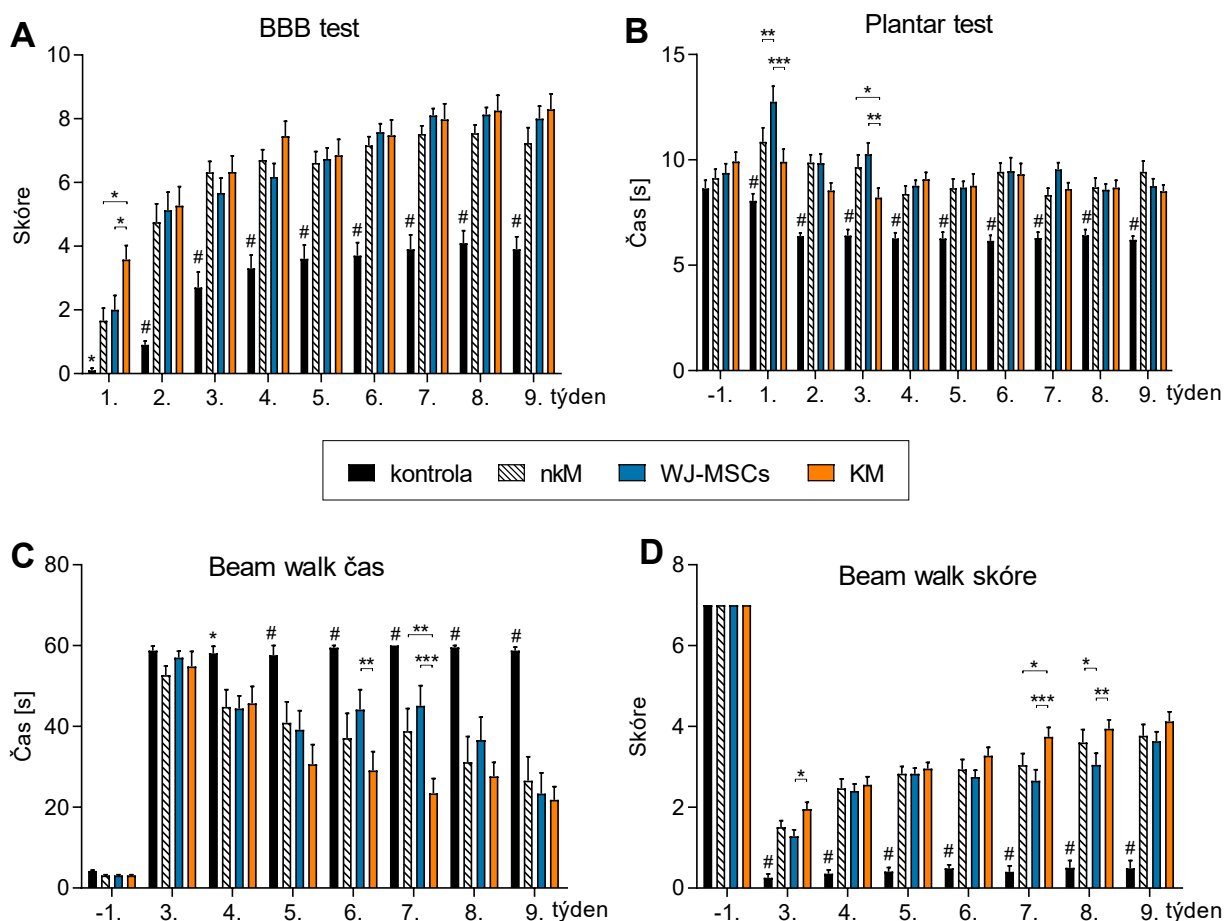
Během předtestovacího týdne zvládla zdravá zvířata přejít kladinu za 2–5 s bez rozdílu mezi jednotlivými skupinami. Poté byl test prováděn od 3. týdne po zranění. Od 4. týdne až do konce experimentu došlo ke snížení BW času u všech tří léčených skupin oproti neléčené kontrolní skupině. U té zůstával BW čas po celou dobu experimentu přibližně stejný, zatímco u všech léčených skupin bylo pozorováno postupné zlepšování. Mimoto měla skupina léčená KM nižší BW čas během 6. a 7. týdne v porovnání s WJ-MSCs a nkM skupinou.

Výsledky BW skóre tato měření potvrzují – skóre neléčené skupiny zůstávalo po celou dobu přibližně stejné a nižší než u všech léčených skupin a v posledních týdnech dosáhla skupina léčená KM lepšího skóre než zbylé dvě léčené skupiny.

5.2.3 Plantar test

Plantar test byl použitý ke zhodnocení termální nocicepce (**Obrázek 10B**). Během předtestování se latence odtažení tlapky na tepelný stimul pohybovala v hodnotách obvyklá pro zdravá zvířata (kolem 9 s) a statistická analýza ukázala, že mezi skupinami nebyl rozdíl.

Od 1. týdne po operaci se výrazně snížila latence neléčené skupiny oproti třem léčeným skupinám a tento rozdíl přetrval po celou dobu experimentu. U léčených skupin hyperalgezie pozorována nebyla. První týden po operaci se zvýšila latence u skupiny léčené WJ-MSCs oproti KM skupině i nkM skupině. Třetí týden se naopak mírně snížila latence u skupiny léčené KM oproti WJ-MSCs i nkM skupině. Ve zbývajících týdnech byla latence všech léčených skupin srovnatelná s hodnotami naměřenými u zdravých zvířat před operací.

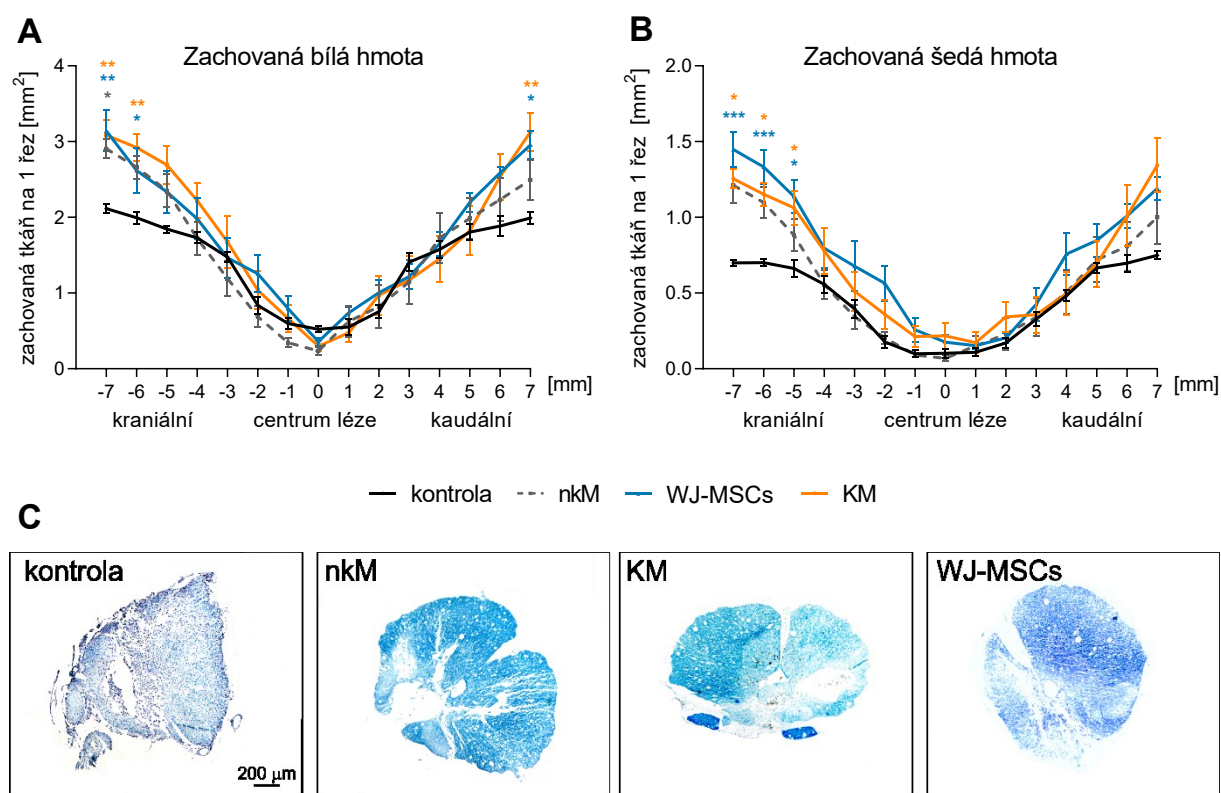


Obrázek 10 - Behaviorální testování. Grafy zobrazují výsledky **(A)** BBB testu, lokomotorické skóre s maximem 21, **(B)** Plantar testu, doba odtažení tlapky na tepelný stimul, **(C)** beam walk testu v podobě času překonání kladiny a **(D)** získaného skóre s maximem 7. Počet potkanů zahrnutých do všech testů byl následující: kontrola $n = 14$, nkM $n = 11$, WJ-MSCs $n = 12$, KM $n = 12$. Hvězdičky (*) a křížky (#) nad kontrolní skupinou znázorňují statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a všemi ostatními skupinami, kde * $p < (0,05-0,01)$ a # $p < 0,0001$. Signifikantní odlišnost mezi léčenými skupinami je * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. (BBB – Basso, Beattie a Bresnahan, KM – kondicionované médium, nkM – nekondicionované kontrolní médium, WJ-MSCs – mezenchymální kmenové buňky izolované z Whartonova rosolu).

5.3 Histologická analýza

5.3.1 Zachovaná bílá a šedá hmota míchy

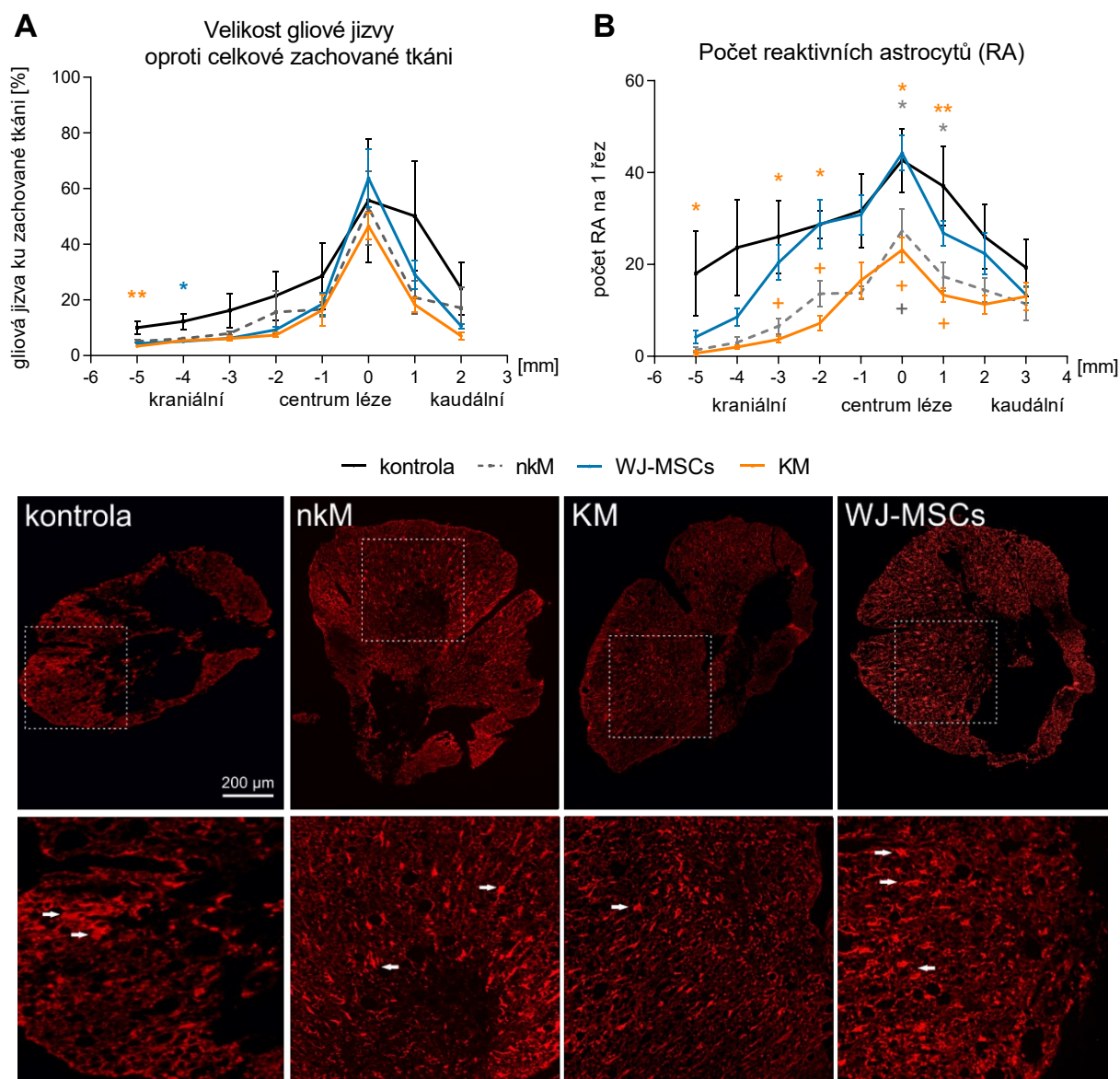
Pomocí histologických řezů barvených luxolovou modří a kresol violetí byla odlišena bílá a šedá míšní hmota a následně bylo změřeno množství zachované tkáně v jednotlivých segmentech míchy po devíti týdnech od SCI (7 segmentů kraniálně a kaudálně od centra léze, které bylo určeno jako segment s nejmenším množstvím tkáně) (**Obrázek 11**). V centru léze bylo u všech skupin poškozeno srovnatelné množství míšní tkáně. V porovnání s neléčenou skupinou došlo u skupin léčených WJ-MSCs a KM k zachování většího množství bílé hmoty ve vzdálené oblasti léze kraniálním i kaudálním směrem a v případě šedé hmoty pouze v kraniální části. U skupiny léčené nkM je také vidět trend zachování většího množství míšní tkáně v okrajových oblastech oproti kontrolní skupině, statisticky průkazný rozdíl je ale pouze v kraniální části bílé hmoty.



Obrázek 11 – Zachovaná míšní tkáň. Pomocí vzorků barvených luxolovou modří a kresol violetí byla určena plocha (mm^2) zachované **(A)** bílé hmoty a **(B)** šedé hmoty míšní. Centrum léze bylo určeno jako kraniokaudální segment s nejmenším množstvím zachované tkáně. Množství potkanů v jednotlivých skupinách zahrnutých do analýzy bylo následující: kontrola $n = 7$, nkM $n = 9$, WJ-MSCs $n = 9$, KM $n = 9$. Hvězdy (*) znázorňují signifikantní rozdíl mezi danou léčenou skupinou a neléčenou kontrolou, kde * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. **(C)** Reprezentativní mikroskopické snímky míšních segmentů 5 mm kraniálně od centra léze, které byly použité k výpočtu plochy zachované míšní tkáně. (KM – kondiciované médium, nkM – nekondiciované kontrolní médium, WJ-MSCs – mezenchymální kmenové buňky izolované z Whartonova rosolu).

5.3.2 Astroglióza a gliová jizva

Analýza vzorků s fluorescenčně barveným GFAP byla použita k výpočtu plochy gliové jizvy a množství reaktivních astrocytů (Obrázek 12), které se vyskytují i mimo gliovou jizvu a mají zvýšenou expresi GFAP, jak bylo popsáno v kapitole 2.1.5. Analýza neprokázala významný rozdíl ve velikosti gliové jizvy mezi jednotlivými skupinami s výjimkou oblasti

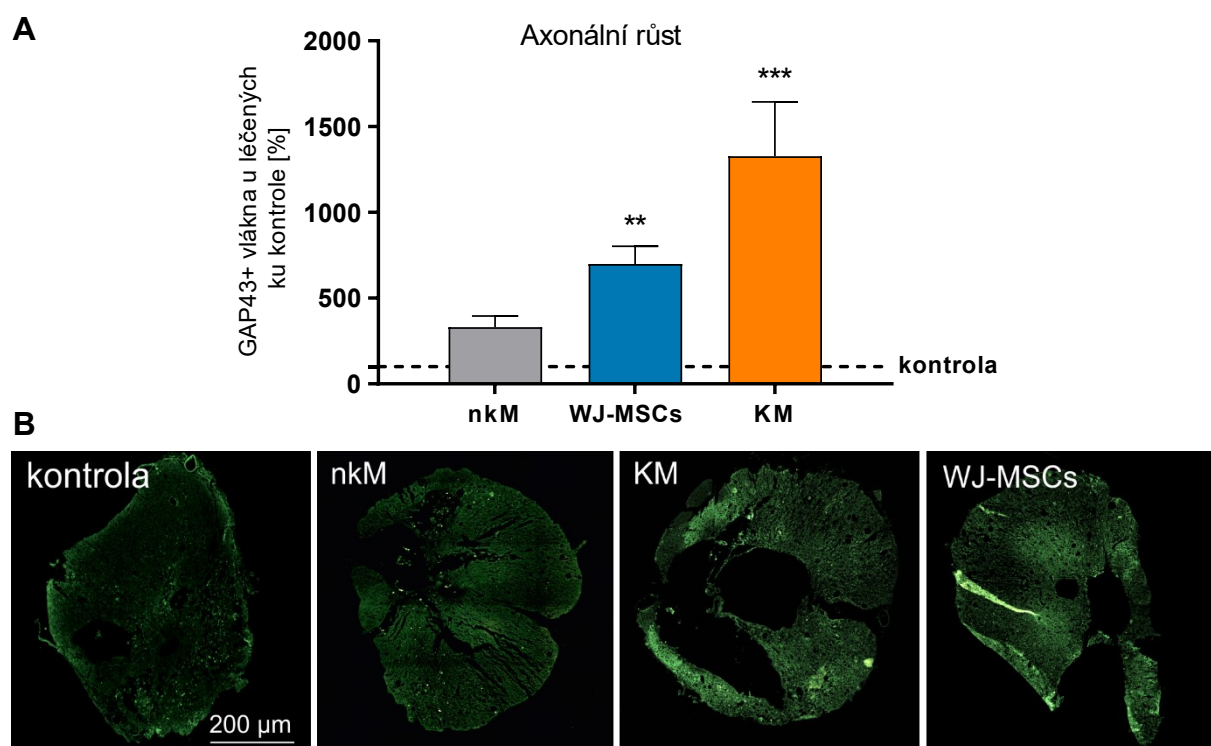


Obrázek 12 - Astroglióza. Pomocí vzorků s fluorescenčně barveným GFAP byla spočítána **(A)** Relativní plocha gliové jizvy okolo centrální kavity v jednotlivých kraniokaudálních segmentech míchy. Zobrazeno jako procentuální část zachované míšní tkáně (podle analýzy v Obrázek 11) a **(B)** Počet reaktivních protoplazmatických astrocytů ve stejných segmentech míchy. Množství potkanů zahrnutých do analýzy bylo následující: kontrola $n = 4$, nkM $n = 5$, WJ-MSCs $n = 5$, KM $n = 5$. Hvězdy (*) ukazují signifikantní rozdíl dané léčby (dle barvy) oproti neléčené kontrole a křížky (+) představují signifikantní rozdíl KM (oranžové) nebo nkM (šedé) vůči WJ-MSCs, kde * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ a + $p < 0,05$. **(C-F)** Reprezentativní mikroskopické snímky imunofluorescenčního barvení GFAP z míšních segmentů 5 mm kraniálně od centra léze. **(G-J)** Detaily snímků C-F vymezené bílými rámečky. Bílé šipky ukazují na reaktivní protoplazmatické astrocyty. (KM – kondicionované médium, nkM – nekondicionované kontrolní médium, WJ-MSCs – mezenchymální kmenové buňky izolované z Whartonova rosolu).

vzdálené 4–5 mm kranálně od centra léze, kde došlo ke zmenšení její plochy u skupin léčených WJ-MSCs a KM. Počet reaktivních astrocytů byl významně menší u skupin léčených KM a nkM v porovnání s neléčenou skupinou, ale i v porovnání se skupinou léčenou WJ-MSCs. Do analýzy nebyly zahrnuty některé vzorky z kaudální oblasti kvůli nedostatečné kvalitě pro vyhodnocení.

5.3.3 Axonální růst

K vyhodnocení počtu nově se prodlužujících nervových vláken bylo použito fluorescenční barvení proteinu GAP43 (Obrázek 13). Bylo spočítáno množství GAP43⁺ vláken v centru léze a 5 segmentech v kranální části, kde byly v předchozích analýzách viditelné největší rozdíly mezi skupinami. Hodnoty byly zprůměrovány a porovnány s kontrolní skupinou, které byla přidělena hodnota 100 %. Oproti neléčené kontrole bylo naměřeno více GAP43⁺ vláken u všech léčených skupin, ale signifikantní nárůst nastal pouze u skupin léčených WJ-MSCs a KM. Konkrétně u skupiny léčené WJ-MSCs bylo nalezeno 7× více GAP43⁺ vláken a skupiny léčené KM 13× více GAP43⁺ vláken než u neléčené kontroly.

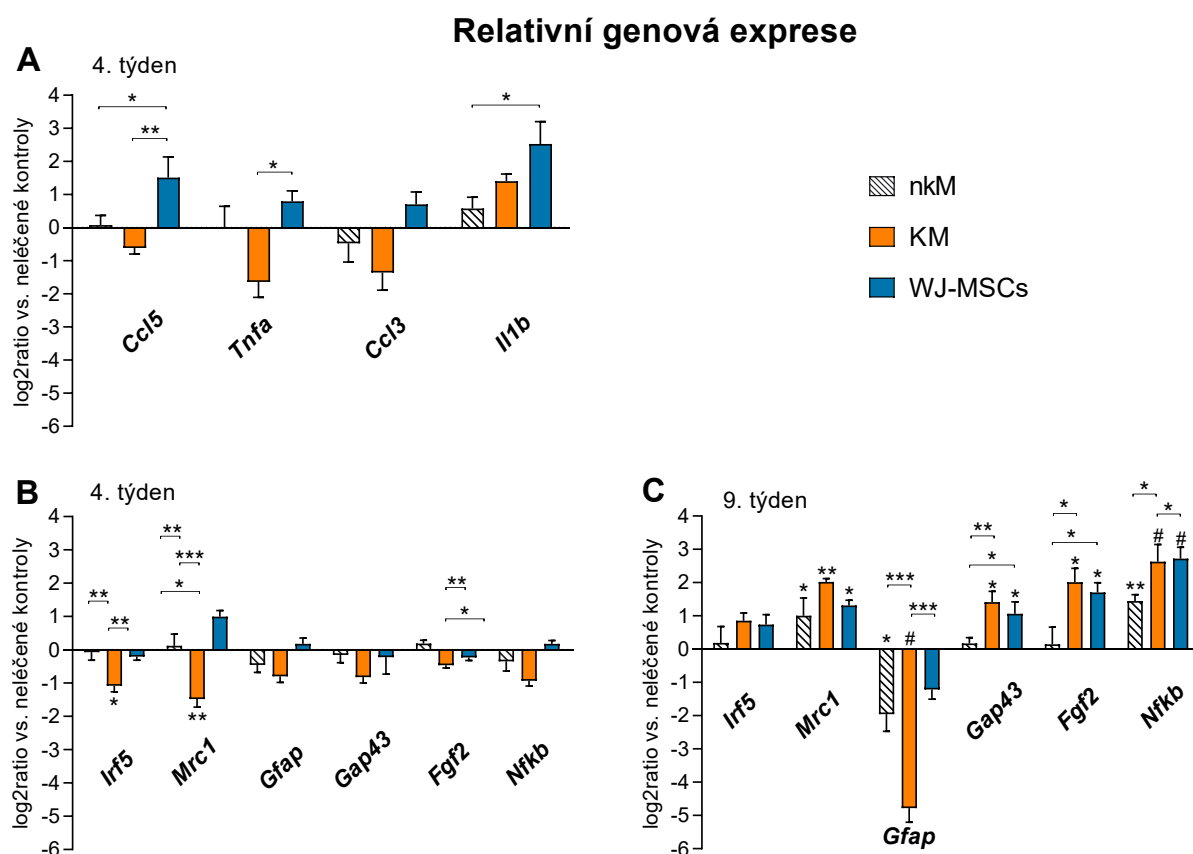


Obrázek 13 - Růst nervových vláken. (A) Průměrný počet prodlužujících se GAP43⁺ vláken u jednotlivých léčených skupin. Zobrazeno jako relativní počet vůči neléčené kontrole, která zde představuje 100 %. Množství potkanů v jednotlivých skupinách zahrnutých do analýzy bylo následující: kontrola $n = 11$, nkM $n = 5$, WJ-MSCs $n = 9$, KM $n = 7$. Hvězdy (*) znázorňují signifikantní rozdíl mezi danou léčenou skupinou a neléčenou kontrolou, kde ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. (B) Reprezentativní mikroskopické snímky imunofluorescenčního barvení GAP43 z míšních segmentů 5 mm kranálně od centra léze. (KM – kondiciované médium, nkM – nekondiciované kontrolní médium, WJ-MSCs – mezenchymální kmenové buňky izolované z Whartonova rosolu).

5.4 Analýza genové exprese

Změna relativní genové exprese vybraných genů byla určena po 4. a 9. týden od vzniku SCI pomocí RT-qPCR (Obrázek 14). Exprese genů *Il2*, *Il6*, *Il10* a *Nos2* nebyla ani v jednom období detekována vůbec (ΔCt 40) a množství RNA pro *Casp3*, *Bcl2*, *Vegfa*, *Cntf*, *Cd163* a *Cd86* bylo velmi blízko detekčního limitu (ΔCt 38–39), proto nebyly do analýzy zahrnuty.

Ve 4. týdnů došlo u skupiny léčené WJ-MSCs v porovnání s neléčenou skupinou ke zvýšení relativní exprese genů pro chemokin *Ccl5*, zánětlivý cytokin *Il1b* a marker M2 fenotypu makrofágů/mikroglíí *Mrc1*. Zároveň s tím, exprese *Ccl5*, *Tnfa* a *Mrc1* byla zvýšená i v porovnání se skupinou léčenou KM. Ve srovnání s neléčenou skupinou došlo naopak u KM skupiny ke snížení exprese genů pro markery M1 (*Irf5*) i M2 (*Mrc1*) fenotypu makrofágů/mikroglíí.



Obrázek 14 - Analýza genové exprese. Změna relativní genové exprese v oblasti míšní léze vybraných genů měřená (A, B) ve 4. týdnů a (C) v 9. týdnů po vzniku SCI. Grafy zobrazují zvýšení nebo snížení genové exprese pomocí log2 měřítka u léčených skupin oproti expresi u neléčené kontroly ($\Delta\Delta\text{Ct}$ metoda). Do analýzy byly zahrnuty duplikáty 4 vzorků od každé skupiny. Hvězdy (*) a křížky (#) nad jednotlivými skupinami ukazují signifikantní rozdíl dané skupiny vůči neléčené kontrole, kde * $p < 0,05$ a # $p < 0,01$. Signifikantní rozdíl mezi léčenými skupinami je * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. (*Ccl 3/5* – ligand C-C chemokin 3/5, *Fgf2* – fibroblastový růstový faktor 2, *Gap43* – protein asociovaný s růstem 43, *Gfap* – gliální fibrilární acidický protein, *Il1b* – interleukin 1beta, *Irf5* – interferon regulující faktor 5, *KM* – kondicionované médium, *Mrc1* – manózoový receptor C-typ 1, *Nfkb* – nukleární faktor kappa B, *nkM* – nekondicionované kontrolní médium, *Tnfa* – faktor nekrotizující nádory, *WJ-MSCs* – mezenchymální kmenové buňky izolované z Whartonova rosolu).

V případě ostatních sledovaných genů, došlo k významné změně jejich exprese až v 9. týdnu. U všech tří léčených skupin byla zvýšená exprese genů *Mrc1* a *Nfkb* oproti neléčené skupině. Exprese genu pro transkripční faktory *Nfkb*, růstový faktor *Fgf2* a protein přítomný v růstovém kuželu axonů *Gap43* byla zvýšená u skupin léčených WJ-MSCs a KM ve srovnání s neléčenou skupinou, ale i nkM skupinou. Nejvýraznější změnou bylo snížení exprese markeru astrogliózy *Gfap* u skupiny léčené KM a nkM v porovnání s neléčenou kontrolou, ale navíc v případě skupiny KM bylo toto snížení významné také v porovnání se skupinou léčenou nkM a WJ-MSCs.

V grafu zobrazujícím výsledky z 9. týdne již nejsou zařazeny geny, jejichž exprese v tomto týdnu buď nebyla detekovaná (*Il1b*, *Tnfa*) anebo byla blízko detekčního limitu (*Ccl3*, *Ccl5*).

6 Diskuze

Aplikace MSCs představuje jednu ze slibných terapií pro léčbu SCI, mezi její velké limitace ale patří krátká doba přežívání transplantovaných buněk a jejich nízká migrace do místa poškození. Proto se rozvíjí studium použití sekretomu MSCs zejména ve formě KM namísto samotných buněk. Studií využívajících KM ale bylo dokončeno poměrně málo, lišily se v mnoha parametrech a znalost léčebného efektu KM je pro klinické použití zatím nedostatečná. Proto bylo cílem této práce porovnat, zda bude mít na hojení SCI u potkanů KM stejné účinky jako MSCs.

Toho bylo dosaženo indukcí experimentálního modelu SCI u potkanů, kterým byly následně podány tři dávky lidských WJ-MSCs, KM anebo nekondiciovaného kontrolního média (nkM). To představovalo stejné kultivační médium, které bylo použito pro přípravu KM včetně dodržení stejných kultivačních podmínek. Efekt léčby u těchto tří skupin byl porovnaný s kontrolní neléčenou skupinou na více úrovních – změny funkce míchy sledované formou behaviorálních testů, spolu s buněčnými a molekulárními změnami pomocí histologického rozboru a analýzy relativní genové exprese.

Jako funkční testy byly zvoleny dva motorické (BBB, beam walk) a jeden senzorický (plantar) behaviorální test. Rozdíl mezi skupinami u zdravých zvířat před operací byl vyloučen díky opakovanému provedení behaviorálních testů v týdnu před vznikem SCI. V tomto týdnu se také potkani naučili provádět úkony spojené s behaviorálním testováním, zejména s BW testem, a proto můžeme vyloučit, že by pozorované zlepšování během jednotlivých týdnů bylo výrazně ovlivněno tím, že by se potkani těmito činnostem teprve postupně učili. Ve všech testech dosáhli všechny tři léčené skupiny signifikantně většího zlepšení než neléčená kontrolní skupina. Rozdíl mezi léčenými skupinami nebyl ve většině týdnů patrný s několika výjimkami, kdy bylo pozorováno zlepšení u skupiny léčené KM.

Možné příčiny pozorovaného zlepšení byly zkoumány pomocí několika histologických analýz a RT-qPCR analýzy vybraných genů. Aplikace WJ-MSCs a KM pravděpodobně omezila šíření sekundárního poranění, protože měla za následek snížení množství poškozené tkáně v oblastech přilehlých centru léze. Dalším přínosem léčby pomocí WJ-MSCs a KM byla podpora neuroregenerace pozorovaná jako zvýšení počtu prodlužujících se GAP43⁺ nervových vláken, spolu se zvýšenou expresí *Gap43* a *Fgf2* v tkáni z oblasti centra léze. V obou případech byl účinek KM signifikantně lepší, než aplikace WJ-MSCs, a zároveň nebyl pozorovaný u skupiny léčené nkM. Přítomnost astrogliózy a gliové jizvy byla měřena v 9. týdnu od SCI, kdy převažují inhibiční účinky gliové jizvy nad těmi protektivními.

U žádné skupiny nebylo pozorováno zmenšení plochy gliové jizvy, ale u skupiny léčené KM a v menší míře u skupiny léčené nkM došlo ke snížení počtu reaktivních astrocytů a snížení exprese *Gfap*. Při aplikaci WJ-MSCs toto pozorováno nebylo.

Vedle genů spojených s neuroregenerací byla také měřena exprese genů majících vztah k imunitní reakci v místě léze. Hlavními efektorovými buňkami jsou zde aktivované makrofágy/mikroglie. Jejich přítomnost v lézi je nezbytná pro čištění debris, ale zároveň by bylo vhodné modifikovat jejich fenotyp M2 protizánětlivým směrem. Ke zvýšení exprese markeru M2 fenotypu ve 4. týdnu po SCI došlo pouze po aplikaci WJ-MSCs, zatímco léčba KM měla za následek snížení exprese markeru M1 i M2 fenotypu. V 9. týdnu po SCI už došlo ke zvýšení exprese M2 markeru u všech léčených skupin, nejvíce u skupiny léčené KM. To ale nemusí o přítomnosti a aktivitě makrofágů/mikroglíí v místě léze nic vypovídat, protože neexistují pouze dva vyhraněné fenotypy, ale spíše subpopulace zahrnující kontinuální přechody mezi nimi. Jiná provedená studie ale naznačuje, že sekretom MSCs podporuje zejména CD206⁺ M2 makrofágy.¹³⁸ V *in vitro* studiích vyvolala kultivace KM s nezralými makrofágy/mikroglíemi spíše protizánětlivý a hojivý fenotyp, ale kultivace s aktivovanými makrofágy zánětlivý fenotyp.^{140,154}

Na první pohled může být překvapivé, že pozitivní účinky měla také aplikace nkM. To bylo způsobeno přítomností látek inzulin-transferin-selen (ITS), které byly do média přidány jako alternativa fetálního bovinního séra. Bylo ukázáno, že inzulin ovlivňuje metabolismus neuronů a chrání je před oxidativním stresem.¹⁵⁵ Transferin váže volné toxické molekuly železa a selen je kofaktorem glutathion peroxidázy, která odbourává peroxid vodíku. Kombinace těchto látek tedy mohla snížit poškození buněk volnými radikály, které jsou během sekundárního poškození míchy produkovány. Je ale důležité poznamenat, že ačkoli mělo nkM srovnatelně dobré účinky na výsledky behaviorálních testů, nemělo už oproti KM a WJ-MSCs vliv na snížené poškozené míšní tkáň, regeneraci nervových vláken a pozorovanou změnu genové exprese.

Náplň diplomové práce byla součástí dlouhodobého projektu laboratoře studující použití MSCs a jiných terapeutických látek k léčbě SCI. V oblasti transplantace MSCs není doposud vyřešeno, jaký způsob, doba podání nebo množství buněk jsou pro terapii SCI ideální. V tomto případě bylo zvoleno intratekální podání v subakutní fázi (nejdříve týden po zranění), ve třech dávkách s týdenním rozestupem, přičemž každá dávka obsahovala 1,5 mil buněk. Tato varianta v přechodí práci laboratoře poskytla nejlepší výsledky, a to zejména v případě zlepšení lokomotorických funkcí.¹⁰² Prospěšnost opakovaného podání MSCs v subakutní fázi ukázala také studie Čížkové *et al.*, kde byly BM-MSCs podány intratekálně v jedné dávce

(0,5 mil buněk) nebo tato dávka opakovaně ve třech po sobě jdoucích dnech.¹⁵⁶ Pouze varianta podání 7., 8. a 9. den po SCI přinesla lokomotorické zlepšení, ale ne jedna dávka nebo opakované dávky 3., 4. a 5. den. V návaznosti na předchozí studie naší laboratoře bylo rozhodnuto, že týdenní rozestupy mezi jednotlivými dávkami budou prospěšnější, protože přežívání buněk v místě transplantace a jejich efekt např. na snížení koncentrace zánětlivých cytokinů, byl pozorovaný do určité míry až do dvou týdnů od léčby.^{102,157}

Transplantace MSCs v subakutní fázi se zdá vhodná, protože při aplikaci příliš brzy v prvním týdnu po zranění transplantované buňky nepřežívají pravděpodobně důsledkem silné zánětlivé odpovědi.¹⁵⁶ Naopak v chronické fázi už by bylo obtížnější ovlivnit následky sekundárního poškození a již více maturovanou gliovou jizvu. Na druhou stranu funkční i strukturální zlepšení bylo pozorované i v případě, kdy byly MSCs podané intravenózně v chronické fázi.¹⁵⁸ Pro tento účel byla vybrána doba aplikace buněk 10. týden po SCI, kdy bylo BBB skóre již čtyři týdny v plató fázi. Ihned po transplantaci se u léčené skupiny BBB skóre opět zvyšovalo, zatímco u neléčené ne. V této práci sice nebylo sledováno přežívání buněk, ale do druhého dne po transplantaci migrovalo do poškozené míchy průměrně 5,5 % transplantovaných buněk.

V diplomové práci nebyly MSCs a jejich KM podány systémově, ale intratekálně pomocí lumbální punkce – tedy do prostoru mezi míšními plenami *pia mater* a *arachnoidea*, který je vyplněn mozkomíšním mokem. Tento způsob není tak rizikový jako doručení buněk přímo do parenchymu míchy, což vyžaduje chirurgický zákrok a může nadále zvýšit poškození tkáně. Zároveň jsou ale buňky doručeny blízko k místu poškození a předpokládá se tak větší migrace buněk než při intravenózní aplikaci. Lumbální punkce je v humánní medicíně běžným zákrokem, u kterého není nutná celková anestezie, a na rozdíl od parenchymálního podání umožňuje snadné podání opakovaných dávek. V jedné studii přímo srovnávající způsoby doručení BM-MSCs pro léčbu SCI, mělo na lokomotorické funkce lepší vliv intratekální podání než intraparenchymální.¹⁵⁹ Navíc stejně jako bylo psáno výše, i zde měla lepší efekt vyšší dávka a subakutní fáze nad akutní. Metaanalýza 83 proběhlých kontrolovaných studií ale neprokázala rozdílný vliv na lokomotorické funkce (BBB test) mezi intraparenchymálním, intratekálním a intravenózním podáním.¹⁶⁰

Zajímavé je, že jsou pozorované pozitivní účinky intratekálního podání na mnoha úrovních i přesto, že většina buněk nemigruje do místa poškození, ale zůstává v místě injikování uchycená na *pia mater* nebo v okolí cév, jak bylo pozorováno v několika studiích včetně předchozích studií naší laboratoře.^{102,156,157,161} To podporuje hypotézu, že MSCs

ovlivňují hojení míchy především svým sekretomem, a ne svou přítomností v lézi, a proto by mělo být použití KM adekvátní náhradou.

Když se podíváme na spolehlivost použitých analýz a věrohodnost dat, tak plantar a beam walk test jsou objektivně vyhodnocované metody, které byly provedeny v dostatečném počtu opakování. Určitá míra subjektivnosti by mohla ovlivnit BBB test, ale bylo ukázáno, že jeho výsledky jsou srovnatelné u nezávislých pozorovatelů a tato přesnost se zvyšuje se zkušeností pozorovatele nebo v případě spolupráce dvou a více pozorovatelů.¹⁶² Jednotlivé behaviorální testy a histologické analýzy byly vždy hodnoceny jedním člověkem, zaslepeně a pro každou zadní končetinu zvlášť. Do histologických analýz musel být bohužel zahrnut menší počet zvířat na skupinu, protože některé vzorky nebyly pro vyhodnocení dostatečně kvalitní. Pokaždé byl ale počet postačující pro statistické zpracování. Pro zvýšení přesnosti RT-qPCR byly použity jako zdroj fluorescence TaqMan hydrolyzační sondy, které se na cDNA váží specificky, reakce pro jednotlivé vzorky byly provedeny v duplikátech a vždy byla zahrnuta také negativní kontrola. Výsledky relativní genové exprese nám však pouze ukáží, zda byl zkoumaný gen exprimován více či méně než gen referenční, to ale nutně neznamená, že byl daný protein skutečně produkován. Produkce proteinů GAP43 a GFAP byla nepřímou sledována v histologické analýze a kolegové měřili množství vybraných cytokinů v mozkomíšním moku a krvi u potkanů usmrčených ve 4. týdnu po SCI viz článek (příloha 9.1). V mozkomíšním moku byl detekovaný pouze chemoatraktant různých typů leukocytů *Ccl5*, jehož hladina byla signifikantně zvýšena pouze u skupiny léčené WJ-MSCs. U této skupiny byla také ve stejné době zvýšená exprese *Ccl5* v tkáni z centra léze. V séru byly detekovány zvýšené hladiny zánětlivých cytokinů $TNF\alpha$ a $IL1\beta$ u všech zahrnutých skupin vůči zdravé kontrole, ale pouze po aplikaci WJ-MSCs bylo toto zvýšení signifikantní. Oproti zdravé kontrole došlo také ke zvýšení sérové koncentrace $IL2$ a *Ccl3* u WJ-MSCs skupiny, a *Ccl5* u všech skupin včetně té neléčené. To ukazuje, že samotné poranění míchy stimuluje zánětlivou odpověď a atrahuje buňky imunitního systému do místa poranění, ale aplikace WJ-MSCs na rozdíl od jejich KM tuto reakce ještě zvyšuje.

Použitý experimentální model SCI (balónková ischemická kompresní léze) je klinicky relevantní. Modeluje situaci lidských zranění, která vznikají např. luxací obratle nebo tlakem úlomků obratle.¹⁵⁰ Mezi výhody modelu patří jeho jednoduché provedení bez potřebných speciálních přístrojů a možnost kontrolovat míru poranění (a s tím související míru spontánní regenerace) pomocí objemu nafouknutého balonku. Laminektomie není provedena u obratle v místě poranění jako u jiných modelů, průběh sekundárního poranění proto není ovlivněn dekompresí míchy.¹⁵⁰ Naopak nevýhodou představuje fakt, že není monitorována rychlost

a kontrolována míra nafouknutí balonku, a proto může vzniknout odchylka v závažnosti vzniklého poranění mezi jednotlivými zvířaty.

Ale i přes klinickou relevantnost se model od reálných lidských zranění podstatně liší, což je jednou z velkých limitací provedeného experimentu. Aplikované MSCs a jejich KM byly studovány na poranění stejné etiologie, rozsahu a lokalizace u zvířat se stejným věkem a pohlavím. To jsou všechno faktory velmi odlišné u lidských pacientů, které zároveň mají vliv na průběh hojení SCI.⁴⁶

Druhým omezením experimentu je použití xenogenního modelu transplantace, což by v případě klinické aplikace nenastalo. Sekretom potkaních a lidských MSCs se může lišit, např. imunosupresivní vlastnosti lidských, opičích nebo prasečích MSCs jsou mediovány prostřednictvím produkce IDO, ale u MSCs hlodavců pomocí NOS2.¹⁶³ Proto bylo cílem vyzkoušet účinky sekretomu lidských MSCs, které by případně v budoucnu mohly být přeneseny do klinického výzkumu. Nicméně, jak potvrzují získaná data prokazující snížení počtu reaktivních astrocytů u skupiny léčené KM, tato bezbuněčná alternativa do určité míry odbourává i omezení vázané na xenogenní model.

Bylo provedeno několik studií využívající allogenní model transplantace KM pro terapii SCI.^{140–142} Je složité srovnávat výsledky těchto studií mezi sebou a s výsledky diplomové práce, protože se liší mnoha faktory, které je mohly ovlivnit (**Tabulka 2**). Parametry nejbližší této diplomové práci je zřejmě studie Čížkové *et al.*, ve které bylo intratekálně aplikováno KM připravené z potkaních BM-MSCs.¹⁴² Byl zde také zvolen model balónkové kompresní léze, ale s menším objemem nafouknutého balónku (12,5 μ l oproti 15 μ l), tedy i s méně závažným poraněním. Proto bylo nejvyšší dosažené BBB skóre u obou sledovaných skupin (KM, nkM) vyšší než dosažené BBB skóre v této práci. To bylo ve většině 10 měřených týdnů u KM skupiny průměrně o 4–5 bodů vyšší než u nkM skupiny. Protože nkM v této práci obsahovalo inzulin-transferin-selen, může to být porovnáno s rozdílem mezi KM skupinou a neléčenou kontrolou, který byl od 2. týdne průměrně 3–5 bodů. V obou pracích došlo také k obdobnému zvětšení plochy zachované míšní tkáně v kraniální a kaudální oblasti přilehlé centru léze a zvýšení počtu GAP43⁺ nervových vláken. V těchto parametrech měla tedy aplikace potkaních BM-MSCs 1., 5., 9. a 13. den po SCI podobné účinky jako aplikace lidských WJ-MSCs 7., 14. a 21. den po SCI.

Tabulka 2 – Odlišnost studií využívajících KM v terapii SCI. [KM – kondicionované médium, MSCs – mezenchymální kmenové buňky (BM-MSCs izolované z kostní dřeně, WJ-MSCs izolované z Whartonova rosolu), SCI – poranění míchy, T7-10 – thorakální (hrudní) segment 7-10].

Studie	Zdroj KM	Způsob podání	Model SCI	Úroveň SCI
Cantinieux <i>et al.</i> ¹⁴⁰	BM-MSCs	intraparenchymálně, ihned po SCI	kontuze (Infinite Horizon impaktor)	T10
Kanekiyo <i>et al.</i> ¹⁴¹	BM-MSCs	intratekálně, ihned po SCI a souvisle po 2 týdny (katetr s osmotickou pumpou v boční mozkové komoře)	kontuze (New York University impaktor)	T8/9
Čížková <i>et al.</i> ¹⁴²	BM-MSCs	intratekálně, 4 dávky 1. 5. 9. a 13. den po SCI (katetr v cisterna magna)	komprese (balónkový model)	T8
Asadi-Golshan <i>et al.</i> ¹⁴³	lidské MSCs z dentální pulpy	intraparenchymálně v kolagenovém hydrogelu ihned po SCI	komprese (svorkový model)	T7
diplomová práce	lidské WJ-MSCs	intratekálně, 3 dávky 7. 14. a 28. den po SCI (lumbální punkce)	komprese balónkový model)	T8

Ostatní studie uvedené v Tabulka 2 se od této liší nejen zdrojem MSCs, ale také použitým modelem SCI a dobou aplikace KM. Jak bylo psáno výše, MSCs transplantované v akutní fázi příliš nepřežívají, proto ani nebyl při jejich brzké aplikaci sledován pozitivní efekt na hojení míchy. Aplikace KM ihned po vzniku SCI vedla ke zlepšení BBB skóre oproti kontrolní skupině v obou studiích využívající potkaní BM-MSCs, ale pouze ve studii Kanekiyo *et al.* byl také signifikantní rozdíl v množství prodlužujících se nervových vláken.^{140,141} Takto časná aplikace KM ale není pro klinické použití příliš reálná. Mimoto byl studován vliv KM připraveného z lidských MSCs izolovaných z dentální pulpy, které bylo doručeno přímo do místa poranění v kolagenovém hydrogelu.¹⁴³ Samotná aplikace KM nebo hydrogelu nepřinesla žádný výsledek, ale jejich kombinace vedla ke zlepšení všech provedených behaviorálních testů, včetně testu citlivosti na chlad, BBB a beam walk testu. Už zde ale nebyla provedena žádná histologická ani jiná analýza.

Proteomická analýza použitého KM ukázala, že obsahuje růstové a neurotrofní faktory (HGF, BDNF, NGF, faktor odvozený od stromálních buněk), látky důležité pro migraci buněk imunitního systému (monocytární chemoatraktantní protein, solubilní buněčné adhezni molekuly), látky související s imunomodulací (IDO, IL6) a angiogenezí (VEGFA), popsáno v příloze 9.1. To je v souladu s jinými pracemi, ve kterých bylo studováno složení sekretomu lidských WJ-MSCs. Mimo tyto látky produkovaly také neurotrofiny 3 a 4, další chemokiny

(CCL3, CCL5, IL8, interferonem γ indukovaný protein 10), cytokiny (antagonista IL1 receptoru, IL12, INF α) a látky spojené s angiogenezí (angiopoetin 1, placentární růstový faktor).^{93,164} Sekretom se ale může lišit na základě původu MSCs. Proto byl vybrán Whartonův rosol jako zdroj MSCs, jehož KM dle předchozí analýzy obsahovalo více látek prospěšných pro hojení poraněné míchy než KM připravené z MSCs z jiných zdrojů.¹⁴⁶

Složení použitého KM bylo také z velké části podobné sekretomu potkaních BM-MSCs použitého ve studiu Cantinieaux *et al.* (uvedena v Tabulka 2), kde byl navíc detekován tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 a cytokiny indukovaný chemoatraktant neutrofilů 3.¹⁴⁰ U obou prací ale není vyloučeno, že KM obsahovalo i jiné látky, jejichž přítomnost nebyla měřena.

Složení sekretomu MSCs lze ovlivnit kultivačními podmínkami např. hypoxií nebo působením cytokinů, růstových faktorů a hormonů.¹⁶⁵ Proto by do budoucna bylo vhodné stanovit kultivační podmínky, při kterých WJ-MSCs produkují největší množství faktorů s neuroregeneračním potenciálem. Terapeutické účinky KM připraveného z takovýchto buněk by pak mohly být porovnány s účinky KM připraveného dle postupu v této práci. K dosažení co největších terapeutických účinků by ale bylo ideální kombinovat aplikaci KM s dalšími typy experimentálních terapií jako jsou biomateriály, látky blokující inhibiční molekuly nebo enzymy štěpící komponenty gliové jizvy.

7 Závěr

Tato práce ukázala, že opakovaná intratekální aplikace sekretomu WJ-MSCs v podobě KM může mít podobné nebo lepší terapeutické účinky na hojení SCI než transplantace samotných WJ-MSCs. V případě behaviorálních testů došlo k funkčnímu zlepšení u potkanů léčených oběma látkami, stejně tak ke snížení množství poškozené tkáně, ale jen po aplikaci KM bylo pozorováno také snížení počtu reaktivních astrocytů. Dále ve srovnání s léčbou WJ-MSCs došlo k prodlužování více nervových vláken a snížení relativní genové exprese genů spojených se zánětlivou odpovědí v krátkodobém měřítku. Práce je limitována použitým zvířecím modelem, který ačkoliv je klinicky relevantní, nese několik odlišností od lidských poranění. Přesto tyto výsledky ukazují na určitý potenciál KM v léčbě SCI, který by dále mohl být zvýšen kombinací s další terapií nebo terapiemi.

8 Použitá literatura

Označení * v případě citace článku typu review

- 1.* Gage, F. H. & Temple, S. Neural stem cells: Generating and regenerating the brain. *Neuron* **80**, 588–601 (2013).
2. Fiorelli, R., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J.-M. & Raineteau, O. The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. *Glia* **61**, 2100–2113 (2013).
- 3.* Charles Molnar, J. G. 16.1 Neurons and glial cells. *Concepts of Biology - 1st Canadian Edition* (2015). Dostupné z: <https://opentextbc.ca/biology/>. (Viděno: 5. květen 2020)
- 4.* Brosius Lutz, A. & Barres, B. A. Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Developmental Cell* **28**, 7–17 (2014).
5. WHO. WHO Fact sheet: Spinal cord injury. (2013). Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>. (Viděno: 17. duben 2020)
6. Česká společnost pro míšní léze ČLS JEP. Dostupné z: <https://www.spinalcord.cz/cz/statistiky/>. (Viděno: 17. duben 2020)
7. National Spinal Cord Injury Statistical Center. Spinal cord injury facts and figures at a glance. (2020). Dostupné z: <https://www.nscisc.uab.edu/Public/Facts and Figures 2020.pdf>. (Viděno: 17. duben 2020)
- 8.* Norenberg, M. D., Smith, J. & Marcillo, A. The pathology of human spinal cord injury: Defining the problems. in *Journal of Neurotrauma* **21**, 429–440 (2004).
- 9.* David, G. *et al.* Traumatic and nontraumatic spinal cord injury: Pathological insights from neuroimaging. *Nature Reviews Neurology* **15**, 718–731 (2019).
- 10.* Alizadeh, A., Dyck, S. M. & Karimi-Abdolrezaee, S. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Front. Neurol.* **10**, (2019).
11. Liu, D., Thangnipon, W. & McAdoo, D. J. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res.* **547**, 344–348 (1991).
12. Didangelos, A. *et al.* High-throughput proteomics reveal alarmins as amplifiers of tissue pathology and inflammation after spinal cord injury. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
13. Pineau, I. & Lacroix, S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: Multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J. Comp. Neurol.* **500**, 267–285 (2007).
- 14.* Greenhalgh, A. D. & David, S. Differences in the phagocytic response of microglia and peripheral macrophages after spinal cord injury and its effects on cell death. *J. Neurosci.* **34**, 6316–6322 (2014).

15. Pineau, I., Sun, L., Bastien, D. & Lacroix, S. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain. Behav. Immun.* **24**, 540–553 (2010).
16. Taoka, Y. *et al.* Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* **79**, 1177–1182 (1997).
- 17.* Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* **3**, 23–35 (2003).
18. Kroner, A. *et al.* TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron* **83**, 1098–1116 (2014).
- 19.* Kong, X. & Gao, J. Macrophage polarization: A key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 941–954 (2017).
- 20.* David, S. & Kroner, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience* **12**, 388–399 (2011).
- 21.* Brennan, F. H. & Popovich, P. G. Emerging targets for reprogramming the immune response to promote repair and recovery of function after spinal cord injury. *Curr. Opin. Neurol.* **31**, 334–344 (2018).
22. Walsh, J. T. *et al.* MHCII-independent CD4⁺ T cells protect injured CNS neurons via IL-4. *J. Clin. Invest.* **125**, 699–714 (2015).
- 23.* Schimmel, S., Acosta, S. & Lozano, D. Neuroinflammation in traumatic brain injury: A chronic response to an acute injury. *Brain Circ.* **3**, 135 (2017).
24. Ren, X. *et al.* Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. *J. Neurosci.* **31**, 8556–8563 (2011).
25. James, N. D. *et al.* Conduction failure following spinal cord injury: Functional and anatomical changes from acute to chronic stages. *J. Neurosci.* **31**, 18543–18555 (2011).
- 26.* Eng, L. F. & Ghirnikar, R. S. GFAP and astrogliosis. in *Brain Pathology* **4**, 229–237 (1994).
27. Frisén, J., Johansson, C. B., Török, C., Risling, M. & Lendahl, U. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.* **131**, 453–464 (1995).
28. Do Carmo Cunha, J. *et al.* Responses of reactive astrocytes containing S100 β protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: Implications for wound repair and neuroregeneration. *Wound Repair Regen.* **15**, 134–146 (2007).
29. Jones, L. L., Margolis, R. U. & Tuszynski, M. H. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **182**, 399–411 (2003).

30. Rhodes, K. E., Raivich, G. & Fawcett, J. W. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience* **140**, 87–100 (2006).
31. Lytle, J. M., Chittajallu, R., Wrathall, J. R. & Gallo, V. NG2 cell response in the CNP-EGFP mouse after contusive spinal cord injury. *Glia* **57**, 270–285 (2009).
32. Soderblom, C. *et al.* Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *J. Neurosci.* **33**, 13882–13887 (2013).
33. Göritz, C. *et al.* A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* (80-.). **333**, 238–242 (2011).
34. Zhu, Y., Soderblom, C., Trojanowsky, M., Lee, D.-H. & Lee, J. K. Fibronectin matrix assembly after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **32**, 1158–1167 (2015).
35. Hara, M. *et al.* Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat. Med.* **23**, 818–828 (2017).
36. Wanner, I. B. *et al.* Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **33**, 12870–12886 (2013).
37. Faulkner, J. R. *et al.* Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **24**, 2143–2155 (2004).
38. Bush, T. G. *et al.* Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**, 297–308 (1999).
39. Tran, A. P., Warren, P. M. & Silver, J. The biology of regeneration failure and success after spinal cord injury. *Physiological Reviews* **98**, 881–917 (2018).
40. Buss, A. *et al.* NG2 and phosphacan are present in the astroglial scar after human traumatic spinal cord injury. *BMC Neurol.* **9**, 32 (2009).
41. Wang, H. *et al.* Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. *J. Cell Sci.* **121**, 3083–3091 (2008).
42. Siebert, J. R. & Osterhout, D. J. The inhibitory effects of chondroitin sulfate proteoglycans on oligodendrocytes. *J. Neurochem.* **119**, 176–188 (2011).
43. Bradbury, E. J. *et al.* Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**, 636–640 (2002).
- 44.* Siddiqui, A. M., Khazaei, M. & Fehlings, M. G. Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. in *Progress in Brain Research* **218**, 15–54 (Elsevier B.V., 2015).
45. Fehlings, M. G. *et al.* A clinical practice guideline for the management of acute spinal cord injury: Introduction, rationale, and scope. *Global Spine Journal* **7**, 84S-94S (2017).

- 46.* Lim, P. A. & Tow, A. M. Recovery and regeneration after spinal cord injury: A review and summary of recent literature. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* **36**, 49–57 (2007).
47. Betz, R. *et al.* The 2019 revision of the International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury (ISNCSCI)—What’s new? *Spinal Cord* **57**, 815–817 (2019).
48. Waters, R. L., Adkins, R. H. & Yakura, J. S. Definition of complete spinal cord injury. *Paraplegia* **29**, 573–581 (1991).
49. Roberts, T. T., Leonard, G. R. & Cepela, D. J. Classifications in brief: American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **475**, 1499–1504 (2017).
- 50.* Dalamagkas, K., Tsintou, M., Seifalian, A. & Seifalian, A. M. Translational regenerative therapies for chronic spinal cord injury. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, (2018).
51. Grossman, R. G. *et al.* A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **31**, 239–255 (2014).
52. Casha, S. *et al.* Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain* **135**, 1224–1236 (2012).
53. Takahashi, H. *et al.* Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: A phase I/IIa clinical trial. *Eur. Spine J.* **21**, 2580–2587 (2012).
54. Dididze, M. *et al.* Systemic hypothermia in acute cervical spinal cord injury: A case-controlled study. *Spinal Cord* **51**, 395–400 (2013).
55. Bracken, M. B. *et al.* A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury: Results of the second national acute spinal cord injury study. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1405–1411 (1990).
56. Liu, Z. *et al.* High-dose methylprednisolone for acute traumatic spinal cord injury: A meta-analysis. *Neurology* **93**, e841–e850 (2019).
57. Tester, N. J., Plaas, A. H. & Howland, D. R. Effect of body temperature on chondroitinase ABC’s ability to cleave chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1110–1118 (2007).
58. James, N. D. *et al.* Chondroitinase gene therapy improves upper limb function following cervical contusion injury. *Exp. Neurol.* **271**, 131–135 (2015).
- 59.* Wu, X. & Xu, X. M. RhoA/Rho kinase in spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* **11**, 23–27 (2016).
60. Fehlings, M. G. *et al.* A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **28**, 787–796 (2011).
- 61.* Pêgo, A. P. *et al.* Regenerative medicine for the treatment of spinal cord injury: More than just promises? *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2564–2582 (2012).

62. Zhao, Y. *et al.* Clinical study of NeuroRegen scaffold combined with human mesenchymal stem cells for the repair of chronic complete spinal cord injury. *Cell Transplant.* **26**, 891–900 (2017).
63. Xiao, Z. *et al.* Significant improvement of acute complete spinal cord injury patients diagnosed by a combined criteria implanted with NeuroRegen scaffolds and mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* **27**, 907–915 (2018).
64. Amr, S. M. *et al.* Bridging defects in chronic spinal cord injury using peripheral nerve grafts combined with a chitosan-laminin scaffold and enhancing regeneration through them by co-transplantation with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: Case series of 14 patient. *J. Spinal Cord Med.* **37**, 54–71 (2014).
65. Theodore, N. *et al.* First human implantation of a bioresorbable polymer scaffold for acute traumatic spinal cord injury: A clinical pilot study for safety and feasibility. *Neurosurgery* **79**, E305–E312 (2016).
- 66.* Rippon, H. J. & Bishop, A. E. Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* **37**, 23–34 (2004).
67. Scott, C. T. & Magnus, D. Wrongful termination: Lessons from the Geron clinical trial. *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 1398–1401 (2014).
68. Curtis, E. *et al.* A first-in-human, phase I study of neural stem cell transplantation for chronic spinal cord injury. *Cell Stem Cell* **22**, 941–950.e6 (2018).
69. Saberi, H. *et al.* Safety of intramedullary Schwann cell transplantation for postrehabilitation spinal cord injuries: 2-Year follow-up of 33 cases. *J. Neurosurg. Spine* **15**, 515–525 (2011).
70. Zhou, X.-H. *et al.* Transplantation of autologous activated Schwann cells in the treatment of spinal cord injury: Six cases, more than five years of follow-up. *Cell Transplant.* **21**, 39–47 (2012).
- 71.* Li, L. *et al.* Effects of transplantation of olfactory ensheathing cells in chronic spinal cord injury: A systematic review and meta-analysis. *European Spine Journal* **24**, 919–930 (2015).
72. Lammertse, D. P. *et al.* Autologous incubated macrophage therapy in acute, complete spinal cord injury: Results of the phase 2 randomized controlled multicenter trial. *Spinal Cord* **50**, 661–671 (2012).
73. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif.* **3**, 393–403 (1970).
- 74.* Squillaro, T., Peluso, G. & Galderisi, U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. *Cell Transplantation* **25**, 829–848 (2016).
75. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
76. Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).

77. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. & Luyten, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* **44**, 1928–1942 (2001).
78. Isobe, Y. *et al.* Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **45**, 124–131 (2016).
79. Zhang, Q. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J. Immunol.* **183**, 7787–7798 (2009).
80. Rotter, N. *et al.* Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* **17**, 509–518 (2008).
81. Erices, A., Conget, P. & Minguell, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* **109**, 235–242 (2000).
82. Wang, H.-S. *et al.* Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **22**, 1330–1337 (2004).
83. in 't Anker, P. S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**, 1338–1345 (2004).
84. Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J. & Hwang, S. M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.* **19**, 1450–1456 (2004).
85. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204–2213 (2006).
- 86.* Ullah, M., Liu, D. D. & Thakor, A. S. Mesenchymal stromal cell homing: Mechanisms and strategies for improvement. *iScience* **15**, 421–438 (2019).
87. Devine, S. M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A. & Hoffman, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* **101**, 2999–3001 (2003).
88. van der Helm, D. *et al.* Local but not systemic administration of mesenchymal stromal cells ameliorates fibrogenesis in regenerating livers. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 6238–6250 (2019).
89. Mert, T. *et al.* Anti-inflammatory and anti-nociceptive actions of systemically or locally treated adipose-derived mesenchymal stem cells in experimental inflammatory model. *Inflammation* **38**, 1302–1310 (2015).
90. Kanazawa, M. *et al.* The influence of systemically or locally administered mesenchymal stem cells on tissue repair in a rat oral implantation model. *Int. J. Implant Dent.* **4**, (2018).
91. Huang, S., Xu, L., Zhang, Y., Sun, Y. & Li, G. Systemic and local administration of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats. *Cell Transplant.* **24**, 2643–2655 (2015).

92. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. & Black, I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* **61**, 364–70 (2000).
93. Balasubramanian, S. *et al.* Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell Biol. Int.* **37**, 507–515 (2013).
- 94.* Fan, X.-L., Zhang, Y., Li, X. & Fu, Q.-L. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* (2020). doi:10.1007/s00018-020-03454-6
- 95.* Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H. F. & Lian, Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: Current status and perspectives. *Cell Transplantation* **23**, 1045–1059 (2014).
- 96.* Krampera, M. Mesenchymal stromal cell licensing: A multistep process. *Leukemia* **25**, 1408–1414 (2011).
97. Xue, Q. *et al.* The negative co-signaling molecule B7-H4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity. *Stem Cells Dev.* **19**, 27–37 (2010).
98. Luz-Crawford, P. *et al.* Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS One* **7**, (2012).
99. Akiyama, K. *et al.* Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* **10**, 544–555 (2012).
100. Eggenhofer, E. *et al.* Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
101. Gyöngyösi, M. *et al.* Serial noninvasive in vivo positron emission tomographic tracking of percutaneously intramyocardially injected autologous porcine mesenchymal stem cells modified for transgene reporter gene expression. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **1**, 94–103 (2008).
102. Krupa, P. *et al.* The effect of human mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in spinal cord injury treatment is dose-dependent and can be facilitated by repeated application. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
103. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. & Ringdén, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* **31**, 890–896 (2003).
104. Poncelet, A. J., Vercruysse, J., Saliez, A. & Gianello, P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation* **83**, 783–790 (2007).
105. Isakova, I. A. *et al.* Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. *PLoS One* **9**, (2014).

106. Gu, L. H. *et al.* Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 444–455 (2015).
107. Hare, J. M. *et al.* Randomized comparison of allogeneic versus autologous mesenchymal stem cells for nonischemic dilated cardiomyopathy: POSEIDON-DCM trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**, 526–537 (2017).
108. Golpanian, S. *et al.* Allogeneic human mesenchymal stem cell infusions for aging frailty. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **72**, 1505–1512 (2017).
109. Carlos Sepúlveda, J. *et al.* Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells* **32**, 1865–1877 (2014).
110. Geißler, S. *et al.* Functional comparison of chronological and in vitro aging: Differential role of the cytoskeleton and mitochondria in mesenchymal stromal cells. *PLoS One* **7**, (2012).
111. Fafián-Labora, J. *et al.* Influence of age on rat bone-marrow mesenchymal stem cells potential. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
112. Yamaguchi, S. *et al.* Age of donor of human mesenchymal stem cells affects structural and functional recovery after cell therapy following ischaemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **38**, 1199–1212 (2018).
113. Block, T. J. *et al.* Restoring the quantity and quality of elderly human mesenchymal stem cells for autologous cell-based therapies. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, (2017).
- 114.* Phelps, J., Sanati-Nezhad, A., Ungrin, M., Duncan, N. A. & Sen, A. Bioprocessing of mesenchymal stem cells and their derivatives: Toward cell-free therapeutics. *Stem Cells International* **2018**, (2018).
115. Kishk, N. A. *et al.* Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair* **24**, 702–708 (2010).
116. Karamouzian, S., Nematollahi-Mahani, S. N., Nakhaee, N. & Eskandary, H. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **114**, 935–939 (2012).
117. Dai, G. *et al.* Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. *Brain Res.* **1533**, 73–79 (2013).
118. Park, J. H. *et al.* Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery* **70**, 1238–1247 (2012).
119. Jiang, P. C. *et al.* A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Exp. Ther. Med.* **6**, 140–146 (2013).
120. Satti, H. S. *et al.* Autologous mesenchymal stromal cell transplantation for spinal cord injury: A Phase I pilot study. *Cytotherapy* **18**, 518–522 (2016).
121. Ra, J. C. *et al.* Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev.* **20**, 1297–1308 (2011).

122. Hur, J. W. *et al.* Intrathecal transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for treating spinal cord injury: A human trial. *J. Spinal Cord Med.* **39**, 655–664 (2016).
123. Liu, J. *et al.* Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **15**, 185–191 (2013).
124. Cheng, H. *et al.* Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in treatment for sequelae of thoracolumbar spinal cord injury. *J. Transl. Med.* **12**, (2014).
125. Kim, H. J. *et al.* Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: A phase 1 clinical trial. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **1**, 95–102 (2015).
126. Brazzini, A. *et al.* Intraarterial autologous implantation of adult stem cells for patients with Parkinson disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **21**, 443–451 (2010).
127. Venkataramana, N. K. *et al.* Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl. Res.* **155**, 62–70 (2010).
128. Canesi, M. *et al.* Finding a new therapeutic approach for no-option Parkinsonisms: Mesenchymal stromal cells for progressive supranuclear palsy. *J. Transl. Med.* **14**, 127 (2016).
129. Oh, K. W. *et al.* Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med* **4**, 590–597 (2015).
130. Staff, N. P. *et al.* Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS. *Neurology* **87**, 2230–2234 (2016).
131. Gothelf, Y. *et al.* Safety and efficacy of transplantation of nurown (autologous mesenchymal stromal cells secreting neurotrophic factors) in patients with ALS: A phase 2 randomized double blind placebo controlled trial. *Cytotherapy* **19**, S23 (2017).
132. Mohyeddin Bonab, M. *et al.* Autologous mesenchymal stem cell therapy in progressive multiple sclerosis: An open label study. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **7**, 407–414 (2012).
133. Li, J.-F. *et al.* The potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Cell Transplant.* **23**, 113–122 (2014).
134. Riordan, N. H. *et al.* Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis. *J. Transl. Med.* **16**, 57 (2018).
135. Lee, J. S. *et al.* A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* **28**, 1099–1106 (2010).
136. Honmou, O. *et al.* Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* **134**, 1790–1807 (2011).
137. Tsang, K. S. *et al.* Phase I/II randomized controlled trial of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for chronic stroke. *World J. Stem Cells* **9**, 133–143 (2017).
138. Lankford, K. L. *et al.* Intravenously delivered mesenchymal stem cell-derived exosomes target M2-type macrophages in the injured spinal cord. *PLoS One* **13**, (2018).

139. Liu, W. *et al.* Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by suppressing the activation of A1 neurotoxic reactive astrocytes. *J. Neurotrauma* **36**, 469–484 (2019).
140. Cantinieaux, D. *et al.* Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: An original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One* **8**, (2013).
141. Kanekiyo, K. *et al.* Effects of intrathecal injection of the conditioned medium from bone marrow stromal cells on spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma* **35**, 521–532 (2018).
142. Cizkova, D. *et al.* Localized intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells conditioned medium improves functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
143. Asadi-Golshan, R. *et al.* Sensory and motor behavior evidences supporting the usefulness of conditioned medium from dental pulp-derived stem cells in spinal cord injury in rats. *Asian Spine J.* **12**, 785–793 (2018).
144. Donders, R. *et al.* Human Wharton's jelly-derived stem cells display a distinct immunomodulatory and proregenerative transcriptional signature compared to bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* **27**, 65–84 (2018).
145. Drela, K. *et al.* Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy* **18**, 497–509 (2016).
146. Petrenko, Y. *et al.* A comparative analysis of multipotent mesenchymal stromal cells derived from different sources, with a focus on neuroregenerative potential. *Sci. Rep.* **10**, 1–15 (2020).
147. Nekanti, U. *et al.* Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **19**, 117–130 (2010).
- 148.* Davies, J. E., Walker, J. T. & Keating, A. Concise review: Wharton's jelly: The rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1620–1630 (2017).
149. Subramanian, A., Fong, C. Y., Biswas, A. & Bongso, A. Comparative characterization of cells from the various compartments of the human umbilical cord shows that the Wharton's jelly compartment provides the best source of clinically utilizable mesenchymal stem cells. *PLoS One* **10**, (2015).
150. Vanický, I., Urdžíková, L., Saganová, K., Čízková, D. & Gálik, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J. Neurotrauma* **18**, 1399–1407 (2001).
151. Basso, D. M., Beattie, M. S. & Bresnahan, J. C. A Sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* **12**, 1–21 (1995).
152. Goldstein, L. B. & Davis, J. N. Beam-walking in rats: Studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury. *J. Neurosci. Methods* **31**, 101–107 (1990).

153. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77–88 (1988).
154. Cizkova, D. *et al.* Modulation properties of factors released by bone marrow stromal cells on activated microglia: An in vitro study. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
155. Duarte, A. I., Proença, T., Oliveira, C. R., Santos, M. S. & Rego, A. C. Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes* **55**, 2863–2870 (2006).
156. Cizkova, D. *et al.* Repetitive intrathecal catheter delivery of bone marrow mesenchymal stromal cells improves functional recovery in a rat model of contusive spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **28**, 1951–1961 (2011).
157. Urdžíková, L. M. *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 11275–11293 (2014).
158. Morita, T. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a model of chronic spinal cord injury. *Neuroscience* **335**, 221–231 (2016).
159. Pal, R. *et al.* Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Cytotherapy* **12**, 792–806 (2010).
160. Oliveri, R. S., Bello, S. & Biering-Sørensen, F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: Systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol. Dis.* **62**, 338–353 (2014).
161. Ruzicka, J. *et al.* A comparative study of three different types of stem cells for treatment of rat spinal cord injury. *Cell Transplant.* **26**, 585–603 (2017).
162. Basso, D. M. *et al.* MASCIS evaluation of open field locomotor scores: Effects of experience and teamwork on reliability. *J. Neurotrauma* **13**, 343–359 (1996).
163. Su, J. *et al.* Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ.* **21**, 388–396 (2014).
164. Amable, P. R., Teixeira, M. V. T., Carias, R. B. V., Granjeiro, J. M. & Borojevic, R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, (2014).
- 165.* Ferreira, J. R. *et al.* Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in immunology* **9**, 2837 (2018).

9 Přílohy

9.1 Publikovaný článek

Výsledky diplomové práce byly publikované v článku „The Effect of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Their Conditioned Media in the Treatment of a Rat Spinal Cord Injury.“

Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 4516; doi:10.3390/ijms20184516